



**Ana Filipa Barcelos Fernandes**

Licenciada em Química Aplicada

**Estudo preliminar do metaboloma e  
proteoma de estirpes da actinobactéria  
marinha *Streptomyces aculeolatus***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Biotecnologia

Orientador: Doutora Susana Maria Pereira Gaudêncio, Investigadora  
Auxiliar, LAQV-REQUIMTE, UCIBIO-REQUIMTE-FCT/UNL

Co-orientador: Professora Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida,  
Investigadora, UCIBIO-REQUIMTE- FCT/UNL  
Professora Auxiliar, Instituto Superior de Ciências de Saúde Egas Moniz

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Cecília Afonso Roque

Arguente: Doutor Jorge da Silva Dias

Vogal: Doutora Susana Maria Pereira Gaudêncio



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Dezembro 2016**



**Ana Filipa Barcelos Fernandes**

Licenciada em Química Aplicada

**Estudo preliminar do metaboloma e proteoma de  
estirpes da actinobactéria marinha *Streptomyces  
aculeolatus***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Biotecnologia

Orientador: Doutora Susana Maria Pereira Gaudêncio, Investigadora Auxiliar,  
UCIBIO-REQUIMTE, LAQV-REQUIMTE-FCT/UNL

Co-orientador: Professora Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida,  
Investigadora, UCIBIO-REQUIMTE- FCT/UNL  
Professora Auxiliar, Instituto Superior de Ciências de Saúde Egas Moniz

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Cecília Afonso Roque

Arguente: Doutor Jorge da Silva Dias

Vogal: Doutora Susana Maria Pereira Gaudêncio

**Dezembro 2016**



Estudo preliminar do metaboloma e proteoma de estirpes da actinobactéria marinha *Streptomyces aculeolatus*.

Copyright © Ana Filipa Barcelos Fernandes, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



“Na vida nada deve ser temido, somente compreendido.  
Agora é hora de compreender mais para temer menos.”

Marie Curie





## Agradecimentos

Gostaria de expressar o meu sincero agradecimento a minha orientadora Doutora Susana Gaudêncio pela confiança depositada em mim quando me aceitou no grupo de investigação, por me ter dado a conhecer o mundo das actinobactérias marinhas, por todo o acompanhamento, apoio, desafios, conselhos, por todos os momentos de ensino e disponibilidade demonstrada ao longo desta fase.

À minha co-orientadora Professora Doutora Maria Gabriela Almeida pela oportunidade e confiança na integração no seu grupo de investigação, por todos os seus conselhos, partilhas de conhecimentos e momentos de ensino, por todo o apoio, acompanhamento e disponibilidade demonstrada ao longo desta fase.

À mestre Joana Sousa por todo o acompanhamento, por todas as críticas construtivas, pelas reflexões, e essencialmente, por todas as horas despendidas, paciência extrema e ajuda essencial na conclusão deste trabalho.

Ao Doutor José Moura, e à Doutora Isabel Moura pela disponibilização dos laboratórios para a realização desta tese.

À Professora Doutora Ilda Santos-Sanches DCV, UCIBIO-REQUIMTE da FCT-UNL pela disponibilidade do laboratório e por ter fornecido as bactérias utilizadas nos ensaios antimicrobianos.

Ao Doutor Rui Almeida pelo auxílio prestado na *French Press*.

Ao Mikhail Europkin do Instituto de Influenza de São Petersburgo pela realização ensaios antivirais.

À Professora Doutora Rita Sobral do DCV, UCIBIO-REQUIMTE da FCT-UNL pela realização dos ensaios antibiofilme e pela disponibilização do laboratório.

À Doutora Isabel Cunha, ao professor Vítor Vasconcelos e à Joana Almeida do CIIMAR pela execução dos ensaios antifouling.

À Professora Doutora Rosário Mato do DCV, UCIBIO-REQUIMTE da FCT-UNL por ter facultado as bactérias para os ensaios antibacterianos.

À Professora Doutora Paula Castilho, da Universidade da Madeira e à Doutora M. Freitas da Estação de Biologia Marinha do Funchal pelo apoio logístico durante a colheita de amostras.

À Doutora Célia Silveira, aos Mestre Tiago Monteiro e à Sara Gomes por todos os momentos de ensino e partilha de conhecimento ao longo do ano, pela palavra carinhosa que sempre tiveram para comigo, e por tornarem as reuniões numa animação.

À Doutora Florbela Pereira por toda a disponibilidade e simpatia.

Ao Mestre Tiago Dias que foi uma ajuda preciosa no início desta tese.

Aos colegas do grupo das actinobactérias, à Sofia Silva, à Helena Macedo, e ao Fredilson Melo pela ajuda durante este ano, pela disponibilidade e pela simpatia.

À Marisa Paulino pela disponibilidade demonstrada, por todo o apoio e colaboração ao longo do ano, uma grande companheira.

À minha colega de bancada Lúcia Costa pelo companheirismo e ajuda.

Aos colegas do laboratório 202, principalmente à Doutora Daniela Peixoto por toda a disponibilidade em ajudar e simpatia demonstrada.

Aos meus amigos, em especial à Marisa Coelho, à Flávia Freitas, e ao Pedro Ferreira por terem estado comigo este ano, por me compreenderem e por me darem sempre uma razão para sorrir.

Um agradecimento muito especial ao Rafael Mamede e à Sara Cruz, os meus apoios fundamentais ao longo desta caminhada, pelos almoços, pela companhia, pela motivação, pela partilha de conhecimento e experiências, pelas alegrias, pelas frustrações, por terem feito parte desta fase e, principalmente, por serem verdadeiros amigos.

A toda a minha família, especialmente o meu irmão Luís Fernandes, à minha cunhada Filipa Machado, à minha princesa Leonor Fernandes e à minha avó Lucília Barcelos, por todos os dias que eu não estive com vocês, por toda a compreensão e por todo o apoio.

Ao meu Mestre André Gomes, pela amizade, pelo amor, pelo apoio incondicional, por nunca me ter deixado desistir, por aturar o meu mau humor, por ter sido o meu porto de abrigo, a minha força, e a minha coragem ao longo deste ciclo.

Um agradecimento muito especial aos meus pais Ana Fernandes e José Fernandes, por serem fantásticos, pelas oportunidades e aventuras que me permitem realizar, por todo o apoio incondicional, pela confiança depositada em mim e nas minhas capacidades e, essencialmente, por nunca me deixarem falhar. Tudo o que eu sou hoje devo-o a vocês.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e à FEDER pelo financiamento do projeto de I&D ref. PTDC/QUI-QUI/119116/2010, IF/00700/2014, UID/QUI/50006/2013 e UID/Multi/04378/2013 no âmbito do acordo de parceria PT2020 (POCI-01-0145-FEDER-007265), ao 7º Programa Quadro da União Europeia (FP7/2007-2013) sob o acordo nºPCOFUND-GA-2009-246542 e nº269138-NanoGuard.

Muito obrigada a todos, encham-me o coração!

## Resumo

As actinobactérias marinhas têm vindo a ser exploradas como fontes de novos compostos bioativos, apresentando estruturas e atividades biológicas distintas das actinobactérias terrestres. Neste contexto, pretendeu-se estudar duas estirpes pertencentes à espécie *Streptomyces aculeolatus* (PTM-346 e PTM-398) provenientes de sedimentos marinhos recolhidos no arquipélago da Madeira. Esta espécie pertence ao grupo MAR4 tendo como característica principal a produção de isoprenóides híbridos (napiradiomicinas, marinonas, lavanducianinas e nitropirrolinas).

Numa primeira fase do trabalho, separaram-se os metabolitos secundários produzidos pela estirpe PTM-398 por cromatografia *flash* e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), onde se obtiveram 164 compostos. De forma a avaliar a atividade antimicrobiana destes compostos contra bactérias patogénicas *Staphylococcus aureus* COL resistente à meticilina (MRSA, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) e *Enterococcus faecium* EF82 resistente à vancomicina (VRE, Vancomycin Resistant *Enterococci*), foram realizados ensaios antimicrobianos preliminares a 138 dos metabolitos secundários isolados. Estes apresentaram, no geral, baixa atividade antimicrobiana. Os dois compostos mais promissores apresentaram concentrações mínimas inibitórias (MIC) para MRSA COL de 7,81 µg/mL e para VRE EF82 de 3,91 µg/mL. Verificou-se ainda que a estirpe PTM-346 produziu predominantemente marinonas e que a estirpe PTM-398 produziu maioritariamente napiradiomicinas.

Por outro lado, procurou-se caracterizar as proteínas envolvidas na biossíntese dos compostos bioativos destas duas estirpes. Como tal, numa segunda fase deste trabalho, os extratos proteicos totais das estirpes foram analisados por eletroforese bidimensional (2DE), num gradiente de pH 4 - 7. Foram detetados 738 e 866 *spots* de proteínas nos géis de células das estirpes PTM-346 e PTM-398, respetivamente. Pela avaliação estatística foi possível observar 173 *spots* diferenciais, dos quais 110 se encontravam sobre-expressos na estirpe PTM-346 e 63 na estirpe PTM-398. Estes resultados foram relacionados tendo em conta a diversidade filogenética e as eventuais diferenças genómicas entre os dois microrganismos.

**Palavras-chave:** Actinobactérias marinhas, *Streptomyces aculeolatus*, Metabolitos secundários, Ensaios antimicrobianos, 2DE, proteómica diferencial



## Abstract

Marine actinomycetes have been explored as sources of new bioactive compounds which have different structures and activities from the terrestrial ones counterparts. In this context, the aim of this dissertation was to study two strains belonging to the specie *Streptomyces aculeolatus* (PTM-346 and PTM-398) obtained from marine sediments collected in the Madeira archipelago. This specie belongs to the group MAR4 which main feature is the production of hybrid isoprenoids (napyradiomycin, marinone, lavanducyanin and nitropyrrolin).

The first part of the work was to separate secondary metabolites produced by strain PTM-398 using flash chromatography and high-performance liquid chromatography (HPLC). In order to evaluate the antimicrobial activity of the 138 compounds against two pathogenic bacteria methicillin resistant *Staphylococcus aureus* COL (MRSA) and vancomycin resistant *Enterococcus faecium* EF82 (VRE), preliminary antimicrobial assays were performed. These tests revealed that the compounds produced by strain PTM-398 had low antimicrobial activity. The two most promising compounds showed minimum inhibitory concentrations (MIC) for MRSA COL of 7.81 µg/mL and VRE EF82 3.91 µg/mL. It was also found that strain PTM-346 produced predominantly marinones and strain PTM-398 produced mainly napyradiomycins.

Moreover, we intended to characterize the proteins involved in the biosynthesis of the bioactive compounds from these strains. Therefore, in the second part of this work, the total protein extracts of the two strains were analyzed by two-dimensional electrophoresis (2DE) at a pH 4-7 gradient. In the experimental results, 738 and 866 protein spots were detected in the gels of the strains cells PTM-346 and PTM-398, respectively. After statistical evaluation it was observed 173 differential spots, 110 of which were overexpressed by PTM-346 and 63 by PTM-398. These results were related taking in consideration the phylogenetic diversity and eventual genetic differences of both.

**Keywords:** Marine actinomycetes, *Streptomyces aculeolatus*, secondary metabolites, antimicrobial activity, 2DE, differential proteomics



## Índice Geral

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract .....	ix
Índice Geral.....	xi
Índice de Figuras .....	xiii
Índice de Tabelas.....	xv
Lista de Abreviaturas, Acrónimos, Símbolos.....	xvii
1. Introdução .....	3
1.1. Actinobactérias.....	3
1.2. Actinobactérias marinhas .....	4
1.2.1. Metabolitos secundários produzidos por actinobactérias marinhas .....	5
1.2.2. Isolamento e identificação de actinobactérias marinhas .....	7
1.3. Género <i>Streptomyces</i> .....	8
1.3.1. <i>Streptomyces aculeolatus</i> (MAR4) .....	9
1.3.1.1. Metabolitos secundários – Isoprenóides híbridos.....	11
1.3.1.2. Biossíntese dos isoprenóides híbridos .....	13
1.4. Proteómica.....	16
1.4.1. Proteómica em actinobactérias .....	17
1.5. Contextualização e objetivos.....	18
2. Materiais e métodos .....	21
2.1. Reagentes .....	21
2.2. Equipamentos .....	22
2.3. Crescimento celular.....	22
2.4. Separação dos metabolitos secundários .....	23
2.4.1. Cromatografia em coluna <i>flash</i> .....	23
2.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	23
2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos isolados da estirpe PTM-398	25
2.6. Eletroforese bidimensional.....	26
2.6.1. Preparação da amostra.....	26
2.6.2. Quantificação da proteína.....	27
2.6.3. Reidratação das <i>strips</i> .....	27
2.6.4. 1ª Dimensão - Focagem isoeletrica .....	27
2.6.5. Equilíbrio das <i>strips</i> de IPG .....	27
2.6.6. 2ª Dimensão - SDS PAGE .....	28
2.6.7. Coloração .....	28
2.6.8. Análise dos géis 2D.....	28

---

3.	Resultados e discussão .....	33
3.1.	Atividades biológicas dos crudes das estirpes PTM-346 e PTM-398 .....	33
3.1.1.	Fracionamento do crude da estirpe PTM-398 .....	33
3.2.	Isolamento dos compostos da estirpe PTM-398 por cromatografia líquida de alta eficiência .....	34
3.2.1.	Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana da estirpe PTM-398 .....	35
3.2.2.	Deteção preliminar de isoprenóides híbridos .....	37
3.2.2.1.	Comparação dos isoprenoides híbridos produzidos pelas estirpes PTM-346 e PTM-398 .....	39
3.3.	Eletroforese 2D .....	40
4.	Conclusões e perspectivas futuras.....	49
5.	Referências bibliográficas .....	53
6.	Anexos.....	59
6.1.	Anexos 1.....	59
6.2.	Anexo 2 .....	62
6.3.	Anexo 3 .....	68



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> - Árvore radial relacionando as relações filogenéticas de 13 grupos de actinobactérias encontradas em ambientes marinhos em 6 famílias diferentes. ....	5
<b>Figura 1.2</b> - Árvore filogenética do grupo MAR4 baseada na sequenciação do gene 16S rRNA. O * indica as estirpes pertencentes a <i>S. aculeolatus</i> e ** indica a estirpes pertencentes a <i>S. synnematoformans</i> .....	10
<b>Figura 1.3</b> - Colônias pertencentes à espécie <i>S. aculeolatus</i> em meio sólido (A) e meio líquido (B). ....	11
<b>Figura 1.4</b> - Isoprenóides híbridos produzidos por estirpes pertencentes à linhagem MAR4. As porções isoprenóides encontram-se indicadas a verde. ....	12
<b>Figura 1.5</b> - Perfil característico da família das napiradiomicinas (A), lavanducianinas (B), marinonas (C) e nitropirrolina (D). ....	13
<b>Figura 1.6</b> - Via independente de mevalonato (MEPP) (A) e via de mevalonato (MVP) (B). ..	14
<b>Figura 1.7</b> - A primeira etapa da biossíntese de isoprenóides catalisada por PTases.....	15
<b>Figura 2.1</b> - Ilustração da avaliação antimicrobiana dos compostos isolados da estirpe PTM-398 efetuada contra as bactérias patogênicas MRSA COL e VRE EF82. Respetivos volumes das culturas bacterianas, compostos isolados, solução de DMSO e solução de vancomicina colocados nas placas de 96 poços. ....	26
<b>Figura 2.2</b> - Fluxograma do trabalho experimental desenvolvido. A verde escuro observa-se o trabalho realizado para a obtenção dos compostos isolados da estirpe PTM-398 e a verde claro pode-se observar o trabalho realizado para a obtenção dos perfis proteicos das duas estirpes em estudo (PTM-346 e PTM-398). As caixas a branco indicam as técnicas e metodologias usadas em cada passo.....	29
<b>Figura 3.1</b> - Espectro UV do composto F2+F3+F4_F59 da estirpe <i>S.aculeolatus</i> PTM-398, obtido através do isolamento por HPLC fase reversa acoplado com o detetor DAD com um gradiente de eluentes acetonitrilo com 0,1% TFA e água com 0,1% de TFA, com um caudal de 1,5 mL/min. Volume de injeção de 200 µL. O perfil UV observado indica que o metabolito secundário isolado pertence à família das napiradiomicinas. ....	37
<b>Figura 3.2</b> - Espectro UV do composto F5+F6_F41 da estirpe <i>S.aculeolatus</i> PTM-398, obtido através do isolamento por HPLC fase reversa acoplado com o detetor DAD com um gradiente de eluentes acetonitrilo com 0,1% TFA e água com 0,1% de TFA, com um caudal de 1,5 mL/min. Volume de injeção de 200 µL. O perfil UV observado indica que o metabolito secundário isolado pertence à família das marinonas. ....	37
<b>Figura 3.4</b> - Mapa de gel 2D do extrato proteico total da estirpe PTM-346. As proteínas foram separadas em <i>strips</i> de IPG de 11 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. [imagem obtida no software Melanie 7.0] .....	40
<b>Figura 3.5</b> - Mapa de gel 2D do extrato proteico total da estirpe PTM-398. As proteínas foram separadas em <i>strips</i> de IPG de 11 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. [imagem obtida no software Melanie 7.0].....	41
<b>Figura 3.6</b> - <i>Spots</i> sobre-expressos do mapa do gel 2D do extrato proteico total da estirpe PTM-346 de acordo com os critérios <i>fold change</i> maior que 2 e ANOVA menor que 0,05. As proteínas foram separadas em <i>strips</i> de IPG de 11 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. [imagem obtida no software Melanie 7.0].....	42
<b>Figura 3.7</b> - <i>Spots</i> sobre-expressos do mapa do gel 2D do extrato proteico total da estirpe PTM-398 de acordo com os critérios <i>fold change</i> maior que 2 e ANOVA menor que 0,05. As proteínas foram separadas em <i>strips</i> de IPG de 11 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em	

géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. [imagem obtida no <i>software Melanie 7.0</i> ]	43
<b>Figura 6.1</b> - Cromatograma relativo à fração F2+F3+F4 da estirpe PTM-398.	59
<b>Figura 6.2</b> - Cromatograma relativo à fração F5+F6 da estirpe PTM-398.	59
<b>Figura 6.3</b> - Cromatograma relativo à fração F7_F1 da estirpe PTM-398.	60
<b>Figura 6.4</b> - Cromatograma relativo à fração F7_F2 da estirpe PTM-398.	60
<b>Figura 6.5</b> - Cromatograma relativo à fração F8+F9_F1 da estirpe PTM-398.	61
<b>Figura 6.6</b> - Cromatograma relativo à fração F8+F9_F2 da estirpe PTM-398.	61
<b>Figura 6.7</b> - <i>Spots</i> exclusivos do mapa do gel 2D do extrato proteico total da estirpe PTM-346. As proteínas foram separadas em <i>strips</i> de IPG de 11 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. [imagem obtida no <i>software Melanie 7.0</i> ]	68
<b>Figura 6.8</b> - <i>Spots</i> exclusivos do mapa do gel 2D do extrato proteico total da estirpe PTM-398. As proteínas foram separadas em <i>strips</i> de IPG de 11 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. [imagem obtida no <i>software Melanie 7.0</i> ]	69

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b> - Exemplos de metabolitos secundários produzidos por actinobactérias marinhas. ..	7
<b>Tabela 2.1</b> - Composição do meio de cultura A1 (1 L). .....	23
<b>Tabela 2.2</b> - Condições utilizadas no HPLC para a separação dos compostos da estirpe PTM-398 frações F2+F3+F4. ....	23
<b>Tabela 2.3</b> - Condições utilizadas no HPLC para a separação dos compostos da estirpe PTM-398 frações F5+F6.....	24
<b>Tabela 2.4</b> - Condições utilizadas no HPLC para a separação dos compostos da estirpe PTM-398 frações F7_F1.....	24
<b>Tabela 2.5</b> - Condições utilizadas no HPLC para a separação dos compostos da estirpe PTM-398 frações F7_F2.....	24
<b>Tabela 2.6</b> - Condições utilizadas no HPLC para a separação dos compostos da estirpe PTM-398 frações F8+F9_F1. ....	25
<b>Tabela 2.7</b> - Condições utilizadas no HPLC para a separação dos compostos da estirpe PTM-398 frações F8+F9_F2. ....	25
<b>Tabela 3.1</b> - Atividades biológicas dos crudes das estirpes <i>S.aculeolatus</i> PTM-346 e PTM-398. ....	33
<b>Tabela 3.2</b> - Massas das frações da estirpe <i>S. aculeolatus</i> PTM-398 obtidas após a separação por cromatografia flash fase normal com um gradiente de eluentes isoctano/acetato de etilo e metanol/acetato de etilo com as respectivas atividades antimicrobinas contra MRSA COL e VRE EF82. ....	34
<b>Tabela 3.3</b> - Número de compostos isolados em cada fração da estirpe <i>S.aculeolatus</i> PTM-398, obtidos por HPLC de fase reversa com um gradiente de eluentes acetonitrilo com 0,1% TFA e água com 0,1% de TFA, com um caudal de 1,5 mL/min. Volume de injeção de 200µL. ....	35
<b>Tabela 3.4</b> - Quantidade de compostos isolados por HPLC fase reversa da estirpe <i>S.aculeolatus</i> PTM-398, número de compostos avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana e quantidade de compostos com atividade antimicrobiana.....	35
<b>Tabela 3.5</b> - Metabolitos secundários isolados por HPLC fase reversa com melhor atividade contra as bactérias patogénicas MRSA e VRE, com as respectivas MIC e massas.....	36
<b>Tabela 3.6</b> - Número total dos compostos isolados por HPLC fase reversa acoplado com o detetor DAD. Os compostos foram isolados com um gradiente de eluentes, acetonitrilo com 0,1% TFA e água com 0,1% de TFA.O caudal foi de 1,5 mL/min e o volume de injeção de 200µL. Identificação da quantidade de IH em cada fração através dos seus perfis UV. ....	38
<b>Tabela 3.7</b> - Identificação do número de compostos isolados por HPLC fase reversa que apresentaram atividade antimicrobiana (contra MRSA e VRE) e identificação dos seus perfis UV. ....	38
<b>Tabela 3.8</b> - Número total de compostos isolados por HPLC fase reversa das estirpes <i>S.aculeolatus</i> PTM-346 e PTM-398, e quantidade compostos ativos. Quantificação total de compostos pertencentes às famílias napiradiomicinas e marinonas e com atividade.....	39
<b>Tabela 3.9</b> - Resumo da análise dos géis 2D das estirpes PTM-346 e PTM-398.....	42
<b>Tabela 3.10</b> - Valores dos pontos isoelétricos e massas moleculares das proteínas envolvidas nas vias biossintéticas propostas, tendo em consideração as espécies em que estavam descritos. (Informação retirada de <a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a> e <a href="http://web.expasy.org/protparam/">http://web.expasy.org/protparam/</a> ).....	45
<b>Tabela 6.1</b> - Massa e actividade dos compostos isolados da estirpe PTM-398 F2+F3+F4 (MIC) contra MRSA e VRE.....	62
<b>Tabela 6.2</b> - Massa e actividade dos compostos isolados da estirpe PTM-398 F5+F6 (MIC) contra MRSA e VRE.....	63
<b>Tabela 6.3</b> - Massa e actividade dos compostos isolados da estirpe PTM-398 F7_F1 (MIC) contra MRSA e VRE.....	64

<b>Tabela 6.4</b> - Massa e actividade dos compostos isolados da estirpe PTM-398 F7_F2 (MIC) contra MRSA e VRE.....	65
<b>Tabela 6.5</b> - Massa e actividade dos compostos isolados da estirpe PTM-398 F8+F9_F1 (MIC) contra MRSA e VRE.....	66
<b>Tabela 6.6</b> - Massa e actividade dos compostos isolados da estirpe PTM-398 F8+F9_F2 (MIC) contra MRSA e VRE.....	67

## Lista de Abreviaturas, Acrônimos, Símbolos

- 2DE- Eletroforese Bidimensional (do inglês *two dimensional gel eletrophoresis*)
- ADP- Difosfato de adenosina (do inglês *Adenosine Diphosphate*)
- ATP- Trifosfato de adenosina (do inglês *Adenosine Triphosphate*)
- BHI- Infusão de cérebro e coração (do inglês *Brain Heart Infusion*)
- BSA- Albumina do soro Bovino (do inglês *Bovine serum albumin*)
- CBB G25- Azul brilhante de coomassie (do inglês *Coomassie Brilliant Blue G250*)
- cDNA- Ácido desoxirribonucleico complementar (do inglês *Complementary deoxyribonucleic acid*)
- CDP- Citidina difosfato (do inglês *Cytidine diphosphate*)
- CDP-ME- 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol
- CDP-ME2P- 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritriol-2-fosfato
- CHAPS- 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato (do inglês *3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate*)
- CMP- Citidina monofosfato (do inglês *Cytidine monophosphate*)
- CoA- Coenzima A
- CTP- Citidina trifosfato (do inglês *Cytidine triphosphate*)
- DAD- Detetor de fotodiodos (do inglês *Diode array detector*)
- DMAPP- Isômero pirofosfato de dimetilalilo (do inglês *Dimethylallyl diphosphate*)
- DMSO- Dimetil sulfóxido (do inglês *Dimethyl sulfoxide*)
- DNA- Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)
- DNase I- Desoxirribonuclease I
- DO- Densidade ótica
- DTT- Ditioneitol
- DXP- 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato
- FDP- Difosfato de farnesilo (do inglês *Farnesyl diphosphate*)
- FDP sintase- Difosfato de farnesilo sintase (do inglês *Farnesyl diphosphate synthase*)
- GDP- Difosfato de geranilo (do inglês *Geranyl diphosphate*)
- GDP sintase- Difosfato de geranilo sintase (do inglês *Geranyl diphosphate synthase*)
- GGDP- Difosfato de geranilgeranilo (do inglês *Geranylgeranyl diphosphate*)
- GGDP sintase- Difosfato de geranilgeranilo sintase (do inglês *Geranylgeranyl diphosphate synthase*)

- HCl- Ácido clorídrico
- HMBDP- 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato
- HMG-CoA- 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coezima A
- HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)
- IC<sub>50</sub>- Medida da concentração de inibição de metade da população
- IEF- Focagem Isoelétrica (do inglês *Isoelectric Focusing*)
- IH- Isoprenóides híbridos
- IPG *buffer*- Tampão de gradientes de pH imobilizados (do inglês *immobilized pH gradient*)
- IPG- Gradientes de pH imobilizados (do inglês *Immobilized pH gradient*)
- IPP- Difosfato de isopentenilo (do inglês *isopentenyl diphosphates*)
- MALDI-TOF- Ionização por dessorção a laser assistida por matriz seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo (do inglês *Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight*)
- MECDP- 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclo-difosfato
- MEP- 2-c-metil-d-eritritol-4-fosfato (do inglês *2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate*)
- MEPP- Via independente de mevalonato (do inglês *2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway*)
- MIC- Concentração inibitória mínima (do Inglês *Minimum inhibitory concentration*)
- MM- Massa molecular
- MRSA- *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (Methicillin-resistant *S. aureus* COL)
- MS- Espectrometria de massa (do inglês *Mass spectrometry*)
- MS- Espetrometria de massa (do inglês *Mass spetrometry*)
- MVP - Via mevalonato (do inglês *Mevalonate pathway*)
- NADPH- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)
- NRPSs- Péptidos não-ribossomais (do inglês *non-ribosomal peptide synthetases*)
- OASIS- Sistema de identificação ortogonal de sítio ativo (do inglês *Orthogonal Active Site Identification System*)
- p.e- Por exemplo
- PCR- Reação em cadeia de polimerase (do inglês *Polymerase chain reaction*)
- pI- Pontos isoeletricos
- PKSs- Sintetases de policétidos (do inglês *Polyketide synthases*)
- PrISM- Investigação proteômica de metabolismo secundário (do inglês *Proteomic Investigation of secondary Metabolism*)

PSA- PerSulfato de Amónia

PTases- Preniltransferases

PTM – Código das estirpes obtidas dos sedimentos oceânicos do arquipélago da Madeira, Portugal.

RNA- Ácido ribonucleico (do inglês *Ribonucleic acid*)

RNase I- Ribonuclease I

rRNA- Ácido ribonucleico ribossomal (do inglês *Ribosomal ribonucleic acid*)

*S. aculeolatus*– *Streptomyces aculeolatus*

*S. anulatus*- *Streptomyces anulatus*

*S. chrysomallus*- *Streptomyces chrysomallus*

*S. coelicolor*- *Streptomyces coelicolor*

*S. davawensis* - *Streptomyces davawensis*

*S. synnematoformans* - *Streptomyces synnematoformans*

*S. thermoautotrophicus*- *Streptomyces thermoautotrophicus*

SDS- N-dodecil-sulfato de sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulphate*)

SDS-PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (do inglês *Sodium Dodecyl Sodium – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)

TCA- Ácido Tricloroacético (do inglês *Trichloroacetic acid*)

TEMED- Tetrametietilediamina (do inglês *TEtraMethylEthyeneDiamine*)

TFA- Ácido trifluoroacético (do inglês *Trifluoroacetic acid*)

UV- Ultravioleta

VRE- Enterococcus resistente à vancomicina (do inglês *Vancomycin resistant Enterococcus faecium* EF82)





## **Capítulo 1 - Introdução**



## 1. Introdução

### 1.1. Actinobactérias

As bactérias pertencentes à classe das *Actinobactérias* são aeróbias, gram-positivas, apresentam filamentos, esporos e um elevado conteúdo Citosina + Guanina (entre 50% a 70%).<sup>1,2</sup>

Esta classe contém 39 famílias e 130 géneros; alguns exemplos são os géneros *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Micrococcus* e *Micromonospora*. Estes géneros apresentam diferentes morfologias, tais como: cocos (p.e. *Micrococcus*), coco-bacilos (p.e. *Arthrobacter*), hifas curtas e rudimentares (p.e. *Nocardia spp.*), e micélios ramificados e altamente diferenciados (p.e. *Streptomyces*).<sup>1,2</sup> Possuem uma ampla distribuição, tanto terrestre, como aquática. Apesar da sua importância na ecologia dos solos, estas bactérias são conhecidas devido à sua capacidade de produzir metabolitos secundários bioativos bastante valiosos para as indústrias farmacêutica e biotecnológica.<sup>3,4</sup>

Na década de 80, cerca de 70% dos compostos naturais conhecidos eram produzidos por actinobactérias terrestres.<sup>3</sup> No entanto, nas últimas décadas do século passado, verificou-se uma redução na descoberta de novos compostos bioativos provenientes de actinobactérias terrestres devido ao seu estudo exaustivo.<sup>3,5</sup> Existem cerca de 1.000.000 de produtos naturais descritos, sendo que a maioria provém de plantas e de microrganismos. Dos produtos naturais bioativos produzidos por microrganismos, as actinobactérias apresentam-se como as principais produtoras (45%), seguindo-se pelos fungos (38%) e pelas bactérias unicelulares (17%).<sup>6</sup> Contudo é de extrema importância a descoberta de novos compostos bioativos devido ao aumento da resistência aos antibióticos por parte de microrganismos patogénicos e, devido às doenças potencialmente mortais, como é o caso do cancro. Estes factos conduzem à necessidade de explorar novos *habitats* como por exemplo os oceanos.<sup>7</sup>

As actinobactérias marinhas apresentam divergências filogenéticas em relação às actinobactérias terrestres devido a sua adaptação às diferentes condições ambientais encontradas em ambientes marinhos. Como tal, os metabolitos secundários produzidos por actinobactérias marinhas apresentam estruturas e atividades distintas das terrestres.<sup>5,8,9</sup>

Cerca de 70% da superfície terrestre é coberta por oceanos. Estes contêm uma diversidade biológica extraordinária representando mais de 95% de toda a biosfera. As condições ambientais dos oceanos são bastante diferentes das terrestres, e por isso, os microrganismos marinhos têm de se adaptar a condições extremas tais como, altas pressões (1100 atmosferas), temperaturas inferiores a 0°C, condições anaeróbias, condições acídicas ou até temperaturas superiores a 100°C em fontes hidrotermais.<sup>5,10</sup>

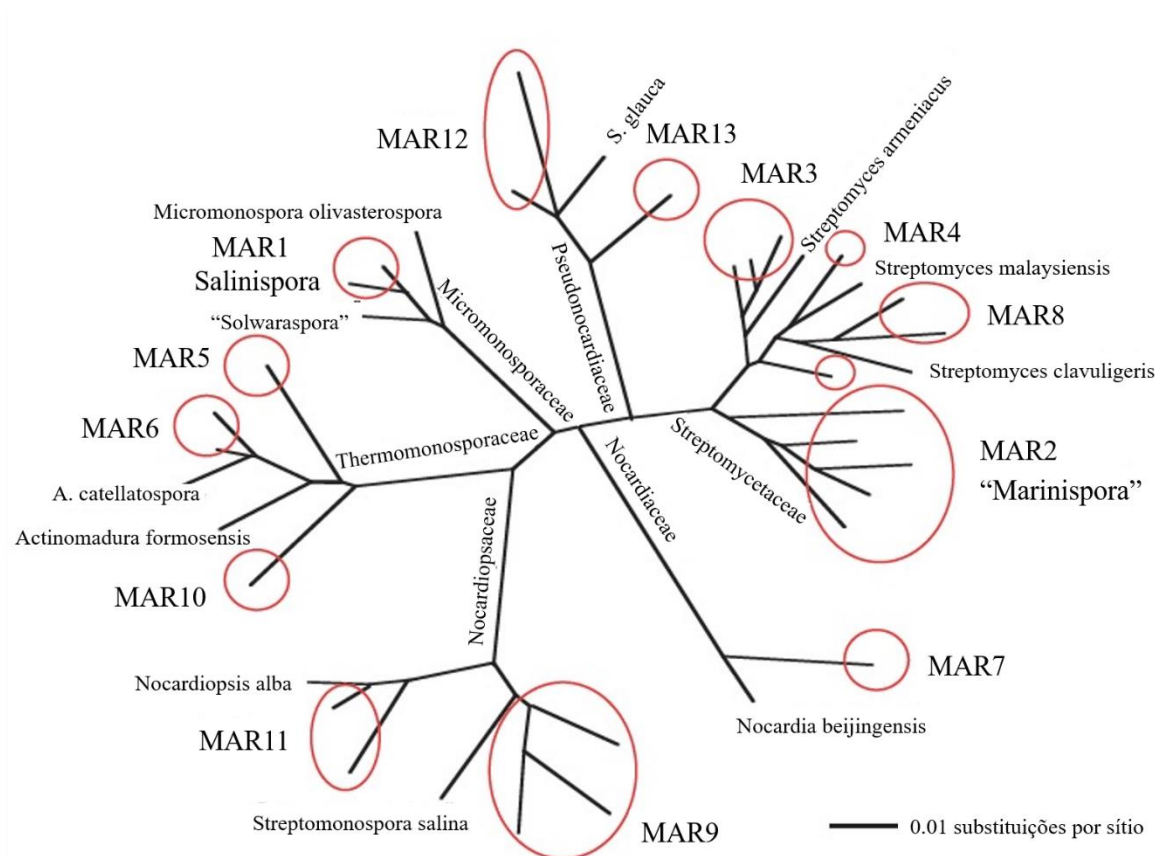
## 1.2. Actinobactérias marinhas

Apesar dos oceanos abrangerem uma extensa área geográfica, o conhecimento sobre a sua diversidade microbiana ainda se encontra pouco explorado, devido às difíceis condições de amostragem. Contudo, o estudo dos ambientes marinhos tem vindo a progredir devido ao desenvolvimento de novas técnicas de recolha de amostras.<sup>11</sup>

A existência de actinobactérias marinhas nem sempre foi bem aceite no meio científico, devido à possibilidade das actinobactérias encontradas nas zonas costeiras poderem ter origem em esporos de actinobactérias terrestres com tolerância ao sal.<sup>12</sup> Contudo, essa hipótese foi afastada quando se isolaram estirpes de sedimentos marinhos recolhidos a elevada profundidade.<sup>13</sup>

Hoje em dia, é possível afirmar que estas actinobactérias se encontram amplamente distribuídas pelo ambiente marinho, quer na água do mar, em plantas, em animais, e em sedimentos oceânicos.<sup>5,14–17</sup>

As primeiras evidências da existência de actinobactérias marinhas estão relacionadas com a descrição da espécie *Rhodococcus marionascene*, em 1984.<sup>18</sup> Desde então, foram descritas outras espécies como sendo actinobactérias marinhas, as quais pertencem aos seguintes géneros: *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium*, *Prauserella*, *Williamsia*, *Verrucosipora*, *Micromonospor*, *Nocardia*, *Serinicoccus*, *Lamerjespora* e *Marnactinospora*.<sup>5,7,10</sup> Os géneros *Salinispora* e *Marinospora*, por sua vez, são actinobactérias exclusivamente marinhas, isto é, todas as espécies pertencentes a estes géneros necessitam obrigatoriamente de sódio para o seu crescimento.<sup>3,17</sup> O género *Salinispora*, o primeiro género a ser reportado como sendo actinobactéria exclusivamente marinha, pertence à família *Micromonosporaceae* e foi designado por MAR1.<sup>3</sup> Posteriormente, foram reconhecidos mais 12 grupos MAR pertencentes a 5 famílias distintas. Como tal, as actinobactérias estão divididas em 6 famílias, *Nocardiaceae*, *Nocardiopsaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Streptomycetaceae*, *Micromonosporaceae* e *Thermonosporaceae*, e por 13 grupos MAR (Figura 1.1).<sup>19</sup>



**Figura 1.1** - Árvore radial relacionando as relações filogenéticas de 13 grupos de actinobactérias encontradas em ambientes marinhos em 6 famílias diferentes. [adaptado de 19]

### 1.2.1. Metabolitos secundários produzidos por actinobactérias marinhas

A produção dos metabolitos secundários é influenciada por diversos parâmetros, como a disponibilidade de nutrientes, pH, pressão parcial de oxigénio, temperatura, luz, agitação, disponibilidade de sais minerais, presença de iões metálicos, presença de precursores, indutores e inibidores.<sup>5,20,21</sup> A otimização das condições poderá levar a um aumento da produção de metabolitos secundários. A sua síntese ocorre maioritariamente durante a fase estacionária, onde o crescimento celular abranda devido à escassez de fontes de carbono, hidrogénio e fósforo. Durante a fase de latência (onde o crescimento celular é lento) e a fase exponencial (onde o crescimento celular é mais pronunciado) a produção de metabolitos secundários é inexistente.<sup>5</sup>

Dentro da classe das actinobactérias, o género *Streptomyces* é responsável pela produção de 75% dos compostos com bioatividade. Os restantes 25% são sintetizados por actinobactérias consideradas raras.<sup>6</sup> Como tal, é de notar que os metabolitos secundários provenientes das actinobactérias são muito importantes no “mundo” dos produtos naturais; apresentam uma vasta gama de atividades biológicas, tais como antibacteriana, antifúngica, anti-tumoral, inseticida, anti-inflamatória, antiparasitária, inibidora de enzimas, antiviral e anti-incrustante.<sup>5,6,22,23</sup>

Um exemplo de um composto bioativo proveniente de uma actinobactéria exclusivamente marinha é a Salinosporamida A, produzido pela espécie *Salinispora tropica*. Foi descoberto em 2003, é uma  $\beta$ -lactona  $\gamma$ -lactâmica bicíclica inibidora do proteassoma mamífero, é capaz de induzir a apoptose em células múltiplas do mieloma.<sup>24</sup> O composto Salinosporamida A é o primeiro metabolito secundário produzido por uma actinobactéria marinha candidato em fase II de ensaios clínico para o tratamento do cancro.<sup>19</sup> Alguns estudos indicam ainda que este composto é capaz de induzir a apoptose de células de mieloma múltiplo, células do cancro do cólon, de leucemia linfocítica crónica, aguda e mielode aguda.<sup>25</sup> Tem sido desenvolvido pela farmacêutica *Nereus Pharmaceuticals Inc.* com o nome de NPI-0052 (Marizomib).<sup>19</sup>

Outro exemplo é o composto Iodopiridona, é um alcalóide produzido pela espécie *Saccharomonospora spp* isolado a partir de sedimentos marinhos. Este apresenta atividade contra o carcinoma do cólon humano (linha celular HCT-116) com um  $IC_{50}$  de 3,6  $\mu$ M.<sup>26</sup>

Pode ainda referir-se o antibiótico Arenimicina, produzido também por actinobactérias marinhas *Salinispora arenicola*. Apresenta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus* resistente à rifampicina e à metacilina, contra *Staphylococci* e contra outros agentes patogénicos humanos gram-positivos.<sup>5,27</sup>

Estes compostos demonstram o enorme potencial das actinobactérias de origem marinha e dos seus metabolitos secundários. Na Tabela 1.1 pode-se observar mais exemplos.

**Tabela 1.1** - Exemplos de metabolitos secundários produzidos por actinobactérias marinhas. [adaptado de 22]

Composto	Atividade Biológica	Espécie
<b>Antraciclinas</b>	Anti-tumoral	<i>Streptomyces galileus</i>
<b>Arenimicina</b>	Anti-microbiano; anti-tumoral	<i>Salinospora arenicola</i>
<b>Avermectina</b>	Anti-parasítico	<i>Streptomyces avermitilis</i>
<b>Bafilomicina</b>	Inibidor de ATPase	<i>Streptomyces griseus</i> , <i>Spreptomyces halstedii</i>
<b>Bis-antraquinona</b>	Anti-microbiano	<i>Streptomyces</i> spp.
<b>Butenolídeos</b>	Anti-tumoral	<i>Strptovercillium luteovercillatum</i>
<b>Carboxamicina</b>	Anti-microbiano; anti-tumoral	<i>Streptomyces</i> spp.
<b>Higromicina</b>	Anti-microbiano; imunossupressor	<i>S. hygrosopicus</i>
<b>Lajollamicina</b>	Anti-microbiano	<i>Streptomyces nodosus</i>
<b>Lincomicina</b>	Anti-microbiano; inibidor da biossíntese proteica	<i>Streptomyces lincolnensis</i>
<b>Marinomicina A–D</b>	Anti-microbiano; anti-tumoral	<i>Marinispora</i>
<b>Mitomicina C</b>	Anti-tumoral	<i>Streptomyces lavendulae</i>
<b>Pacificanonas A &amp; B</b>	Anti-microbiano	<i>Salinospora pacifica</i>
<b>Piericidina</b>	Anti-tumoral	<i>Streptomyces</i> spp.
<b>Proximicina</b>	Anti-bacteriano; anti-tumoral	<i>Verrucosipora</i> spp.
<b>Rapamicina</b>	Imunossupressor; antifúngico	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>
<b>Salinosporamida B &amp; C</b>	Anti-tumoral	<i>Salinispora tropica</i>
<b>Estreptocordina</b>	Anti-tumoral	<i>Streptomyces</i> spp.
<b>Estreptomicina</b>	Anti-microbiano	<i>Streptomyces griseus</i>
<b>Estreptozaotocina</b>	Diabetogénico	<i>Streptomyces achromogenes</i>
<b>Tetraciclinas</b>	Anti-microbiano	<i>Streptomyces achromogenes</i> ; <i>Streptomyces rimosus</i>
<b>Tirandamicina</b>	Anti-microbiano	<i>Streptomyces</i> spp.
<b>ZHD-0501</b>	Anti-tumoral	<i>Actinomadura</i> spp.

### 1.2.2. Isolamento e identificação de actinobactérias marinhas

Existem diversas técnicas para o isolamento de actinobactérias, sendo as mais usuais as *dependentes* e as *independentes* de cultura. Nestas técnicas, deve-se ter em conta vários fatores, tais como a seleção dos *habitats* de onde são recolhidas as amostras, o pré-tratamento das amostras, a utilização de meio de cultura específico e seletivo, o equilíbrio entre condições de cultura e metodologias específicas para cada género.<sup>28</sup>

A identificação das actinobactérias marinhas *dependente* de culturas consiste em tornar o isolamento mais específico, quer por um pré-tratamento físico e químico das amostras quer por utilização de meios de cultura específicos e seletivos. Utilizam-se técnicas de enriquecimento para aumentar a quantidade de actinobactérias desejada e técnicas de pré-tratamento com antibióticos para eliminar bactérias ou contaminantes indesejáveis.<sup>29</sup> A utilização de meio de cultura e água do mar favorece o isolamento de actinobactérias exclusivamente marinhas como o género *Salinispora* e *Marinospora*.<sup>3,17</sup>

A identificação pela técnica *independente* de cultura tem como base a extração direta dos ácidos nucleicos das amostras, envolvendo a amplificação do ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*, DNA) ou do ácido desoxirribonucleico complementar (*complementary deoxyribonucleic acid*, cDNA) a partir do ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*, RNA) extraído da amostra, por reação em cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) para posterior análise da diversidade das moléculas amplificadas. Os produtos amplificados podem também ser clonados e sequenciados de forma a identificar e enumerar novas actinobactérias presentes na amostra.<sup>22</sup> Como tal, foram desenvolvidos *primers* seletivos para a amplificação por PCR do gene 16S do ácido ribonucleico ribossomal (*ribosomal ribonucleic acid*, rRNA) de famílias de *Actinomycetales* como *Micromonosporaceae*, *Streptomycetaceae*, *Streptoporangaceae* e *Thermomonosporaceae* e do género *Dactylosporangium*.<sup>30</sup>

### 1.3. Género *Streptomyces*

O género *Streptomyces* pertencente à classe *Actinobacteria*, foi proposto por Waksman e Henrici, em 1943.<sup>31</sup> Atualmente, são conhecidas mais de 600 espécies, as quais se encontram geralmente, em solos terrestres e em sedimentos marinhos, sendo tipicamente saprotróficas. Produzem hifas muito ramificadas e, em caso de stress ambiental, produzem esporos.<sup>31,32</sup> A propriedade mais interessante deste género é a capacidade de produzir metabolitos secundários, como compostos beta-lactâmicos, terpenóides, policetídeos (tipo I, II e III), e isoprenóides híbridos de péptido-policetídeo e de péptidos não-ribossomais.<sup>8,33</sup>

Estes metabolitos secundários apresentam diferentes bioatividades, tais como antifúngicas, antivirais, anti-tumorais, antibióticas e imunossupressoras.<sup>32</sup> Hoje em dia, o género *Streptomyces* é responsável pela produção de 80% dos antibióticos a nível mundial.<sup>8,33</sup>

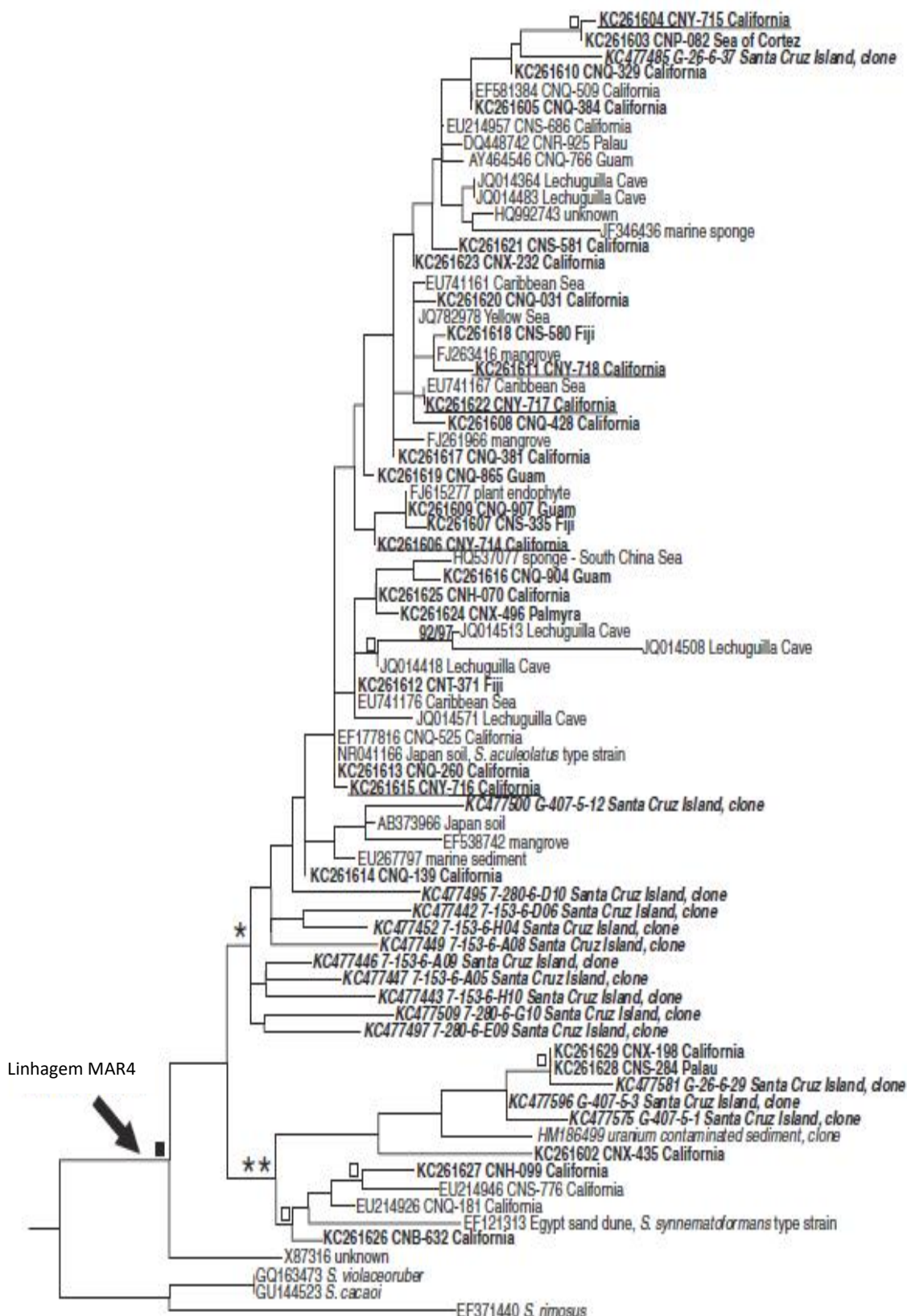
A primeira linhagem de *Streptomyces* de origem marinha foi reportada em 1995 por Morgan *et al.* Neste estudo, descobriu-se que 2 - 5% do rRNA recolhido das bactérias provenientes de sedimentos marinhos hibridavam com sondas específicas para o género *Streptomyces*, e que esta hibridação é distinta de esporos de *Streptomyces* terrestres.<sup>34</sup> Posteriormente a esta descoberta, foram caracterizados muitos compostos bioativos produzidos por estirpes de *Streptomyces* de origem marinha, como por exemplo, o composto Bonactina proveniente da espécie *Streptomyces sp.* BD21-2 que apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e atividade antifúngica; Komodoquinona A isolado a partir da espécie *Streptomyces sp.* KS3 que contém atividade contra a linha celular de neuroblastoma de rato (Neuro-2A) e frigociclinona proveniente da espécie *Streptomyces griseus* (estirpe NTK 97) que exibe atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas.<sup>35-37</sup>



### 1.3.1. *Streptomyces aculeolatus* (MAR4)

A espécie *Streptomyces aculeolatus* pertence à família *Streptomycetaceae* e à linhagem MAR 4. Esta linhagem é essencialmente de origem marinha e é composta por duas espécies, *Streptomyces aculeolatus* e *Streptomyces synnematoformans* (Figura 1.2).<sup>38,39</sup>

Atualmente, a linhagem MAR4 inclui 57 estirpes, das quais 47 foram isoladas a partir de sedimentos marinhos.<sup>38-40</sup> Das duas estirpes não marinhas, a primeira foi isolada no Japão a partir de uma amostra de solo em 1987 por Shomura *et al.* e pertence à espécie *S. aculeolatus*. A segunda, foi isolada a partir de uma amostra de duna de areia no Egito, por Hozzein e Goodfellow em 2007, sendo descrita a espécie *S. synnematoformans*.<sup>41,42</sup> O grupo MAR4 é reconhecido principalmente por ser maioritariamente de origem marinha e por ser uma importante fonte de isoprenóides híbridos (IH).



**Figura 1.2** – Árvore filogenética do grupo MAR4 baseada na sequenciação do gene 16S rRNA. O \* indica as estirpes pertencentes a *S. aculeolatus* e \*\* indica a estirpes pertencentes a *S. synnematoformans*. [Adaptado de 38]

Recentemente foi sequenciado o genoma da estirpe *Streptomyces* sp. *CNQ-509* pertencente à espécie *S. aculeolatus* contendo 8.039.333 de nucleótidos. Identificaram-se 29 ilhas genômicas que poderão estar envolvidas na biossíntese de metabolitos secundários.<sup>43</sup>

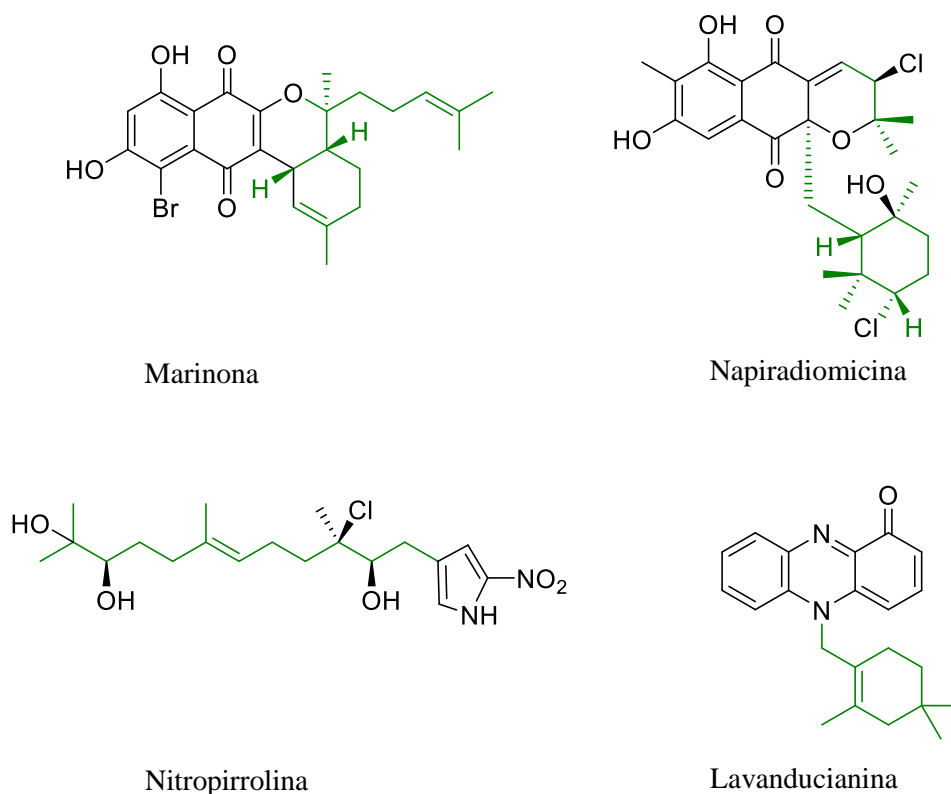
As bactérias pertencentes a esta espécie são gram-positivas, aeróbias, produzem hifas ramificadas, a maioria das suas estirpes cresce somente na presença de água do mar e a temperaturas entre 15°C – 37°C.<sup>44</sup> São reconhecidas pela sua pigmentação, podendo ir do castanho ao laranja, produzem esporos geralmente esbranquiçados e os seus pigmentos variam entre o castanho avermelhado e castanho (Figura 1.3).<sup>41,44</sup>



**Figura 1.3** - Colónias pertencentes à espécie *S. aculeolatus* em meio sólido (A) e meio líquido (B).

#### 1.3.1.1. Metabolitos secundários – Isoprenóides híbridos

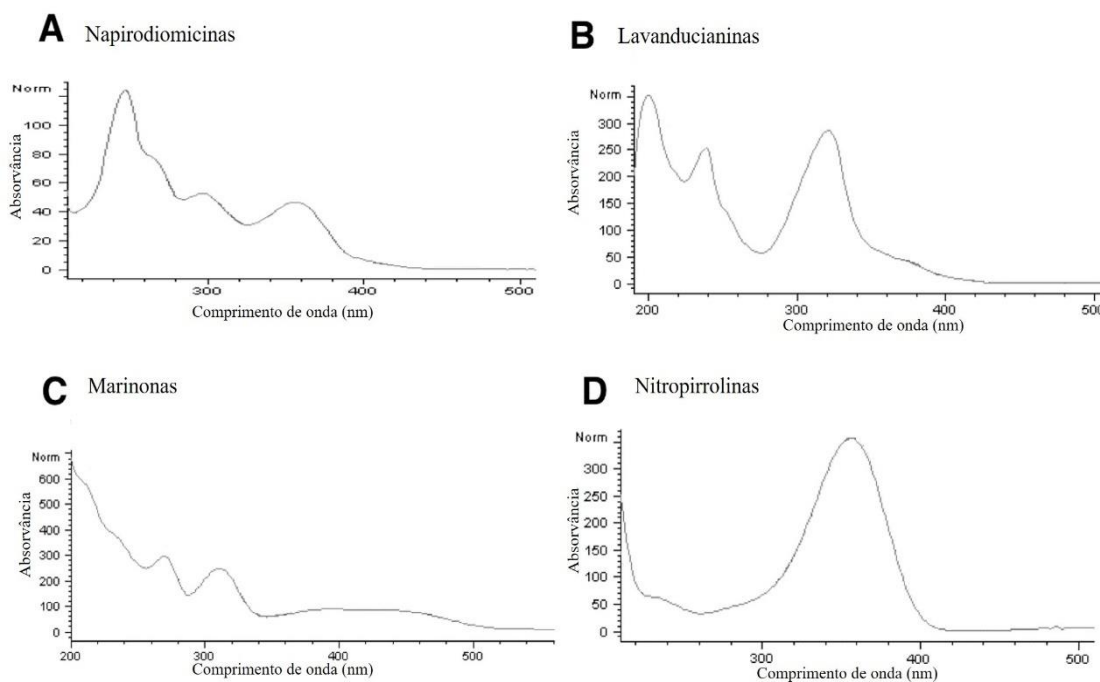
Os isoprenóides híbridos são metabolitos secundários que contêm porções de isoprenóides (unidades repetidas de isoprenos) com diferentes níveis de complexidade que poderão estar ligados a diferentes moléculas como policetídeos, péptidos ribossomais e não-ribossomais, fenazinas, entre outros.<sup>40</sup> Encontram-se divididos por diversas famílias, a linhagem MAR4 produz essencialmente quatro famílias, marinonas, napiradiomicinas, nitropirrolinas e lavanducianinas (Figura 1.4).<sup>39,40</sup>



**Figura 1.4** – Isoprenóides híbridos produzidos por estirpes pertencentes à linhagem MAR4. As porções isoprenóides encontram-se indicadas a verde. <sup>[Adaptado de 40]</sup>

Estes compostos têm estruturas bastante complexas e potentes atividades biológicas como anti-tumoral, anti-microbiana e antifúngica. Estas atividades fazem destacar esta linhagem como um recurso bastante relevante para a potencial descoberta de novos medicamentos.<sup>19, 45</sup>

A identificação destas quatro famílias é facilmente efetuada através do seu perfil de ultravioleta (UV) característico (Figura 1.5). Este perfil pode ser obtido por exemplo na separação dos metabolitos secundários através de cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) caso o detetor associado seja um detetor de fotodíodos (*Diode array detector*, DAD).

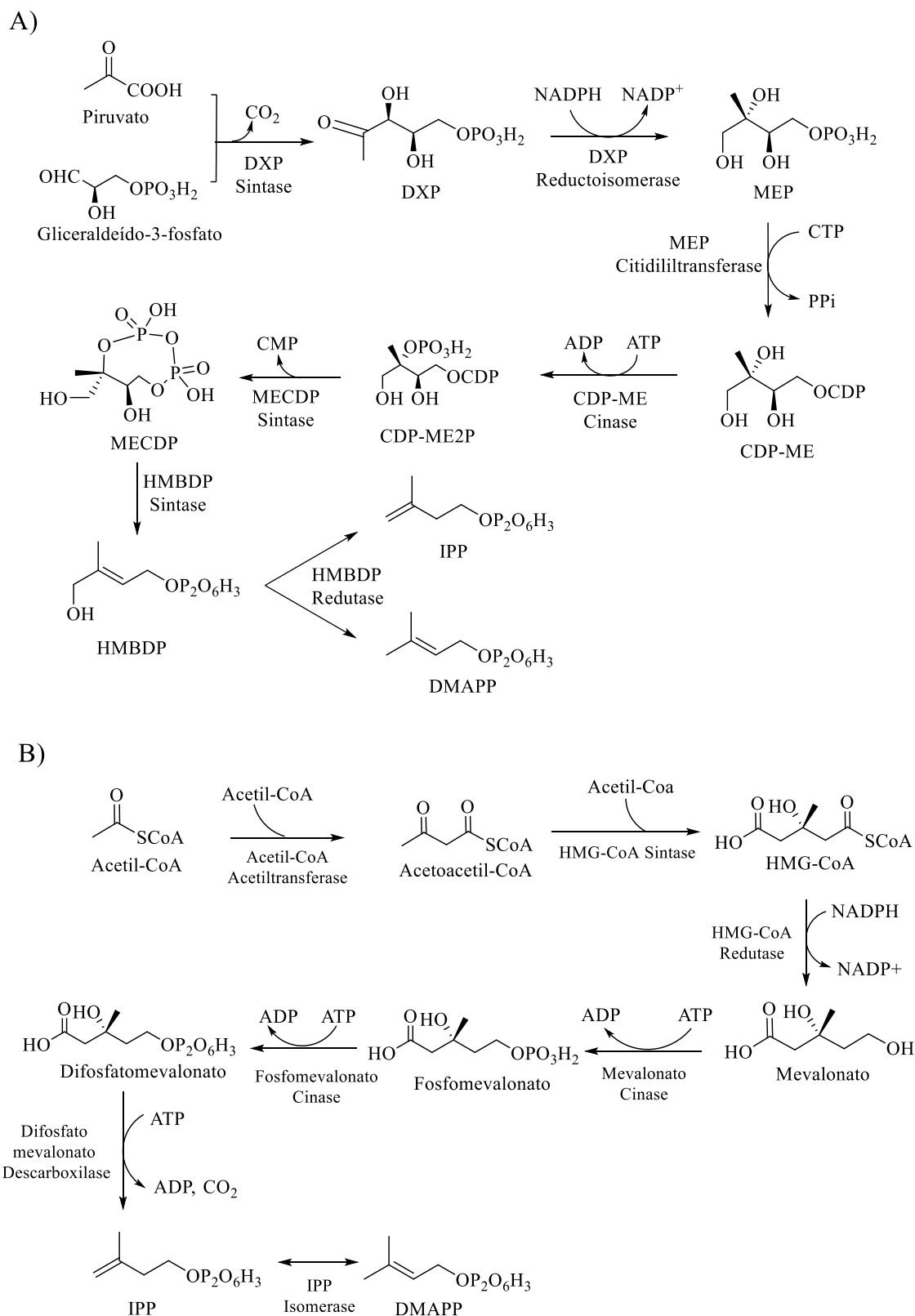


**Figura 1.5** – Perfil característico da família das napirodiomicinas (A), lavanducianinas (B), marinonas (C) e nitropirrolina (D). [adaptado de 38]

### 1.3.1.2. Biossíntese dos isoprenóides híbridos

Todos os isoprenóides são obtidos a partir do mesmo precursor, o isopreno, formado por 5 unidades de carbono (C<sub>5</sub>). Este participa nas reações de formação de isoprenóides em forma de difosfato de isopentenilo (*isopentenyl diphosphate*, IPP) e do seu isômero pirofosfato de dimetilalilo (*dimethylallyl diphosphate*, DMAPP). Todos os compostos que derivam da junção do IPP com DMAPP possuem um esqueleto básico de carbonos com a fórmula (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)<sub>n</sub>. Estes precursores podem ser sintetizados por duas vias: a via de mevalonato (*mevalonate pathway*, MVP) e a via independente de mevalonato também conhecida por a via 2-c-metil-d-eritritol-4-fosfato (*2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway*, MEPP) (Figura 1.6).<sup>46,47</sup> Em geral, a via MVP é utilizada por eucariontes e por arqueobactérias, enquanto que a via MEPP é utilizada por bactérias e eucariontes fotossintéticos.<sup>48</sup>

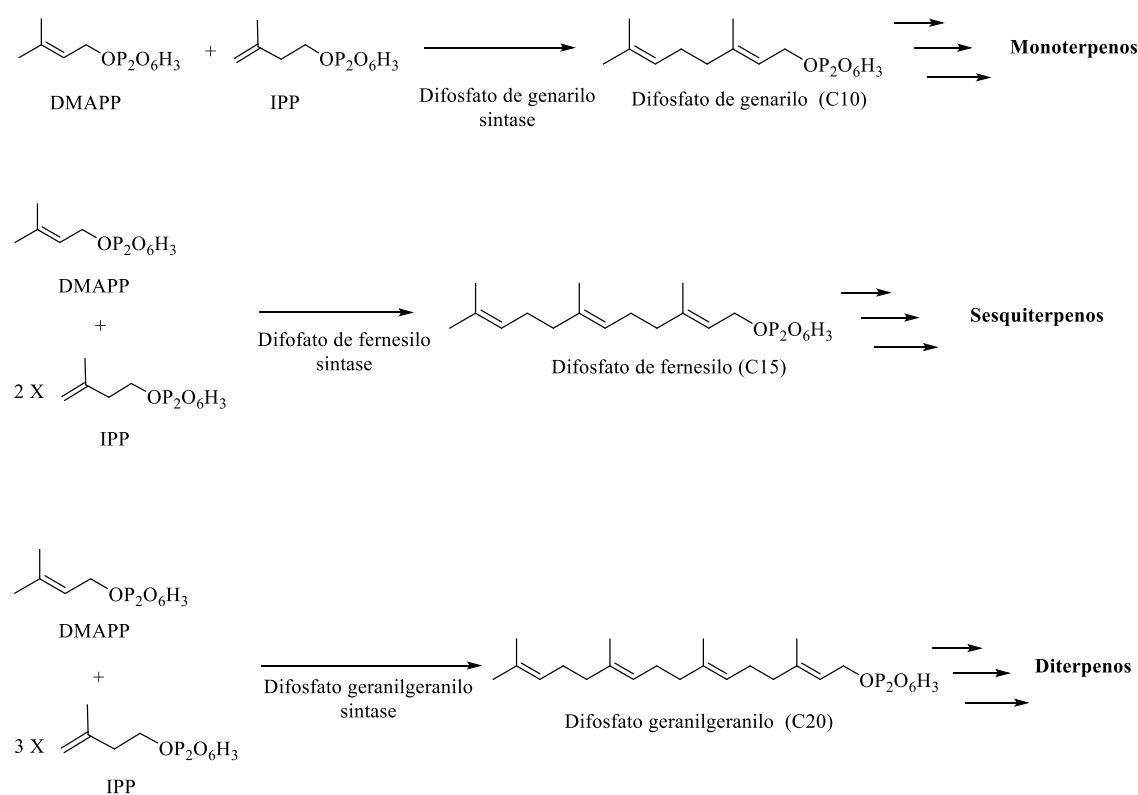
Alguns estudos apontam que as actinobactérias utilizam a via MVP para a produção de metabolitos secundários IH, enquanto outros estudos indicam que o IPP e DMAPP, utilizados na produção de IH, provêm da via MEPP.<sup>49,50</sup> Gallagher e Jensen, ao estudarem o genoma de várias estirpes pertencentes ao género *Streptomyces* (incluindo estirpes pertencentes ao grupo MAR4), concluíram que quando a via MVP se encontra presente no genoma é esta que fornece o isopreno utilizado na biossíntese dos IH. No entanto, também verificaram que existe produção de IH em espécies que não continham a via MVP, e como tal a presença ou ausência da via MVP não é um indicador fiável de que a estirpe produz IH.<sup>39</sup>



**Figura 1.6** - Via independente de mevalonato (MEPP) (A) e via de mevalonato (MVP) (B).

Após a obtenção dos isoprenos, as enzimas preniltransferases (PTases) são responsáveis pela condensação sequencial de IPP com DMAPP. O comprimento da cadeia e sua estereoquímica

são resultado das PTases que catalisam a reação. Por exemplo, as enzimas difosfato de geranilo sintase (*Geranyl diphosphate synthase*, GDP sintase); a difosfato de farnesilo sintase (*farnesyl diphosphate synthase*, FDP sintase) e a difosfato geranilgeranilo sintase (*geranylgeranyl diphosphate synthase*, GGDP sintase), catalisam a adição de uma, duas ou três moléculas de IPP a DMAPP, podendo-se obter o difosfato de geranilo (*Geranyl diphosphate*, GDP) com 10 carbonos, pertencente a classe dos monoterpênicos; o difosfato de farnesilo (*farnesyl diphosphate*, FDP) com 15 carbonos, pertencente a classe dos sesquiterpênicos e difosfato geranilgeranilo (*geranylgeranyl diphosphate*, GGDP) com 20 carbonos, pertencente a classe dos diterpênicos, respectivamente (Figura 1.7).<sup>47</sup>



**Figura 1.7** - A primeira etapa da biossíntese de isoprenóides catalisada por PTases. [adaptado de 47].

As enzimas PTases desempenham um papel importante tanto na biossíntese dos metabolitos primários como secundários. Dentro da família das PTases, existe um sub-grupo de enzimas específico para a produção de IH, as ABBA PTases. Estas são responsáveis pela ligação de isoprenóides a substratos aromáticos. Todas as ABBA PTases caracterizadas estão envolvidas na biossíntese de metabolitos secundários IH. As ABBA PTases são ainda divididas em dois grupos: o grupo contendo as enzimas indole ABBA PTases, as quais ligam substratos de indole aos isoprenóides, e as Orf2 ABBA PTases que anexam isoprenóides a uma grande variedade de substratos aromáticos, como as fenazinas, as naftoquinonas e as aminocumarinas.<sup>39,51</sup>

## 1.4. Proteómica

Apesar dos avanços obtidos no estudo do genoma dos organismos (genómica), estes não são suficientes para explicar toda a complexidade de um ser vivo. O estudo, mesmo que pormenorizado, do genoma não é suficiente para elucidar a função biológica das proteínas que codificam, uma vez que estas podem sofrer modificações pós-tradução, degradação ou até formar complexos multi-proteicos.<sup>52</sup> Como tal, tornou-se crucial estudar as proteínas expressas pela globalidade dos genes, isto é, estudar o proteoma. Devido aos processos pós-tradução mencionados anteriormente, o proteoma torna-se muito mais complexo do que o genoma, sendo bastante dinâmico e pode-se alterar em resposta a estímulos ambientais e celulares.<sup>53</sup>

O estudo do proteoma pode ser efetuado por varias técnicas, sendo a abordagem mais clássica a eletroforese bidimensional (*two dimensional gel eletrophoresis* - 2DE), descrita por O'Farrell em 1975.<sup>54</sup> A técnica eletroforese 2D é efetuada em 5 passos: 1) preparação da amostra; 2) primeira dimensão: focagem isoeletrica (*Isoelectric Focusing* – IEF); 3) preparação para a segunda dimensão (passo de equilíbrio); 4) segunda dimensão: eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (*Sodium Dodecyl Sodium – Polyacrilamide Gel Eletrophoresis* – SDS-PAGE) e 5) visualização das proteínas.<sup>55</sup>

A preparação da amostra é um dos passos mais críticos da eletroforese 2D tendo como objetivo a extração e solubilização das proteínas da amostra, devendo ser otimizado tendo em conta a sua complexidade. Em primeiro lugar, é necessário lisar as células (exceto se for um fluido extracelular) por meios físicos ou químicos. De seguida, procede-se à homogeneização da amostra com inibidor de proteases, prevenindo a degradação das proteínas que pode ocorrer devido a libertação das proteases durante a lise celular, e com endonucleases (DNase e RNase) impedindo que os ácidos nucleicos se liguem às proteínas por interações eletrostáticas interferindo com a focagem isoeletrica das mesmas. Existe ainda a necessidade de desnaturar e solubilizar as proteínas, de modo a que a carga das mesmas não seja alterada, utilizando uma combinação de agentes caotrópicos, como ureia e tiourea e detergentes neutros como CHAPS.<sup>55,56</sup> Por vezes também é necessário remover outro tipo de interferente que a amostra possa conter, como por exemplo, os sais. Neste caso, procede-se à precipitação da proteína através de *kits* comerciais (como o *2-D Clean-Up kit*) ou através de outros tipos de protocolos (precipitação com TCA e acetona gelada, dialise).<sup>56</sup>

Na primeira dimensão, ou seja, na focagem isoeletrica (IEF), as proteínas são separadas de acordo com os seus pontos isoeletricos (pI). É uma técnica eletroforética e é realizada em *strips* com gradientes de pH imobilizados (*Immobilized pH gradient* – IPG). Quando as proteínas presentes na *strip* se encontram sob a influência de um campo elétrico irão migrar até uma região do pH da *strip* que corresponde ao seu pI, ou seja, onde a carga da proteína se anula. Como tal, todas as proteínas ficam posicionadas no local da *strip* em que o pH corresponde ao seu pI.<sup>56</sup>



Após a primeira dimensão, é necessário que as *strips* sejam preparadas para a segunda dimensão. Para tal, são sujeitas a um passo de equilíbrio onde as proteínas são reduzidas com ditioneitol (DTT) e alquiladas com iodoacetamida nos grupos tiol, de modo a prevenir a sua reoxidação no passo seguinte. A iodoacetamida permite ainda a remoção de DTT que se encontra em excesso. De seguida, procede-se à segunda dimensão onde é realizada uma eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE), onde as proteínas são separadas de acordo com a sua massa molecular relativa.<sup>56</sup>

Por fim, e de modo a visualizar as proteínas é necessário corar o gel. As colorações mais comuns são a coloração com azul de coomassie coloidal e com nitrato de prata. Existe ainda uma alternativa de coloração com a marcação com sondas fluorescentes (SYPRO Ruby Protein Gel Stain).<sup>57</sup> Cada mancha – *spot* – observada no gel corresponde idealmente a uma proteína. Como tal, as variações quantitativas observadas nos géis servem de base para seleccionar alguns *spots* de interesse para estudos diferenciais, que por sua vez poderão vir a ser identificadas por espectroscopia de massa (*Mass spectrometry*, MS).<sup>55,57</sup>

#### 1.4.1. Proteómica em actinobactérias

As actinobactérias são responsáveis pela biossíntese de muitos produtos naturais com grande interesse na medicina, na indústria alimentar, química e em técnicas de biorremediação. Em geral, certos metabolitos são produzidos em rendimentos bastante baixos sendo, por isso, importante encontrar estratégias de modo a aumentar o rendimento da sua produção.<sup>58</sup>

Neste campo, a engenharia genética tem vindo a ser uma ferramenta bastante útil e utilizada na descoberta de novos produtos naturais. Porém, nem sempre o que se encontra codificado no genoma é a expressão real dos produtos naturais, sendo este o principal obstáculo da engenharia genética. A observação do produto final da expressão genética por eletroforese bidimensional, juntamente com a espectrometria de massa, podem ajudar a perceber as mudanças na expressão dos genes, podendo dar indicação sobre a regulação de processos biológicos e sobre as vias metabólicas que as suportam.<sup>59</sup>

Os policétidos e os péptidos não-ribossomais são alguns dos metabolitos secundários produzidos por actinobactérias. A sua síntese é efetuada a partir de sintetases de péptidos não-ribossomais (*non-ribosomal peptide synthetases*, *NRPSs*) e por sintetases de policétidos (*polyketide synthases*, *PKSs*). Apresentam uma massa molecular superior a 200 kDa.<sup>60</sup> Tendo em conta esta informação, tem-se vindo a aplicar duas novas abordagens proteómicas, a PrISM (*Proteomic Investigation of secondary Metabolism*) e a OASIS (*Orthogonal Active Site Identification System*). Estas detetam a expressão de conjuntos de genes NRPS/PKS em proteomas bacterianos sem a sequenciação do genoma. Na técnica PrISM procura-se descobrir o produto natural a partir da deteção de enzimas biossintéticas usando a proteómica, e com esta informação descobrir quais os genes biossintéticos que estão a ser expressos e os seus produtos

naturais correspondentes. Com esta abordagem é possível descobrir novos produtos naturais, novas vias, transformações biossintéticas e associar grupos de genes com os metabolitos sintetizados. Esta técnica seleciona as NRPS/PKS pelo seu tamanho, enquanto a técnica OASIS reage quimicamente com os seus sítios ativos.<sup>59</sup>

Foram já reportados vários estudos proteómicos em actinobactérias tendo por objetivo relacionar os perfis globais de expressão de proteínas com a produção de metabolitos secundários em diferentes condições. Como exemplos de actinobactérias estudadas até à data temos as espécies *Amycolatopsis balhimycina*, *Planobispora rosea*, *Kineococcus radiotolerans*, *Arthrobacter phenanthrenivorens*, *Streptomyces coelicolor* e *Streptomyces lividans*.<sup>58,61-66</sup>

### 1.5. Contextualização e objetivos

Tendo em conta que Portugal possui a 3ª maior Zona Económica Exclusiva da União Europeia e a 11ª do mundo, o potencial para descobrir novas espécies de actinobactérias marinhas e de novos compostos bioativos é enorme. Como tal, no âmbito do projeto "Tesouros Oceânicos- Sedimentos oceânicos do arquipélago da Madeira: nova fonte de compostos inovativos e bioactivos" ref. PTDC / QUI-QUI / 119116/2010, obtiveram-se 421 actinobactérias provenientes de sedimentos marinhos do arquipélago da Madeira. Destas, 6 estirpes foram identificadas como pertencentes à espécie *S. aculeolatus*: a estirpe PTM-29, PTM-81, PTM-129, PTM-346, PTM-398 e PTM-420.

Neste trabalho foram analisadas duas estirpes: a PTM-346 recolhida na Madeira a 14 metros de profundidade e a PTM-398 recolhida na Madeira a 1310 metros de profundidade.

Numa primeira fase, separaram-se os metabolitos secundários produzidos pela estirpe PTM-398 por HPLC, avaliaram-se os perfis UV de cada composto separado de modo a determinar a sua família de IH e avaliaram-se as atividades antimicrobianas dos compostos isolados contra as estirpes MRSA COL e VRE EF82. Este estudo já tinha sido previamente realizado para a estirpe PTM-346 no grupo de investigação. Por fim, comparam-se os resultados obtidos para as estirpes PTM-346 e PTM-398. De modo a tentar esclarecer as diferenças observadas procurou-se identificar proteínas envolvidas na biossíntese dos compostos produzidos pelas mesmas estirpes, isto é, potenciais biomarcadores. Para tal, utilizou-se uma abordagem de proteómica diferencial recorrendo à técnica 2DE.

Assim, será possível compreender as vias biossintéticas dos metabolitos bioativos e desta forma maximizar a produção dos compostos que apresentem interesse biotecnológico.

Paralelamente a esta tese foram efetuados os mesmos estudos proteómicos para as estirpes PTM-29 e PTM-129 no âmbito da tese de mestrado da aluna Lígia Costa.

## **Capítulo 2 – Materiais e métodos**



## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Reagentes

Os meios de cultura foram efetuados com amido, extrato de levedura e peptona adquiridos à Becton Dickinson. Para a purificação e separação dos metabolitos secundários, usou-se acetato de etilo (99,8%), isooctano (99,5%), metanol (99,9%), água e acetonitrilo (99,9%, pureza para HPLC) adquiridos à ProLabo; ácido trifluoroacético (*trifluoroacetic acid*, TFA,  $\geq 99,9\%$ ) da Sigma-Aldrich; areia adquirida à Panreac e sílica gel 60 da marca Merk. Para determinar a concentração mínima inibitória dos compostos isolados, as estirpes MRSA e VRE foram crescidas em meio de cultura de infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion*, BHI) adquirido à Becton, Dickinson. De modo a controlar a viabilidade da cultura utilizou-se dimetil sulfoxido (*dimethyl sulfoxide*, DMSO) adquirido a Sima-Aldrich, em vez dos compostos.

Para a preparação dos extratos proteicos totais foram utilizados inibidores de proteases (complete EDTA free), desoxiribonuclease I (DNase I) proveniente da Roche e ribonuclease I (RNase I) da Sigma, todos com um elevado grau de pureza para biologia molecular. Para a precipitação das proteínas utilizou-se ácido tricloroacético (*Trichloroacetic acid*, TCA,  $\geq 99\%$ ) e acetona ( $\geq 99\%$ ), provenientes da Sigma-Aldrich.

As *strips* com gradientes de pH imobilizados (*Immobilized pH gradient* - IPG) da GE Healthcare foram reidratadas com uma solução constituída por 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato(3-[(3-*cholamidopropyl*)dimethylammonio]-1-*propanesulfonate*) (CHAPS, 99%) da Calbiochem, tampão de gradientes de pH imobilizados (*immobilized pH gradient*, IPG buffer) pH 3-10 e DTT (99%) adquiridos à GE Healthcare, ureia (99,5%) e tioureia (99%) da marca Merck.

No equilíbrio das *strips* de IPG utilizaram-se duas soluções contendo azul bromofenol e ureia (99,5%) adquiridos à Merck, glicerol da marca Panreac, ácido clorídrico (*Chloridric Acid*, HCl, 37%) da Pronalab, N-dodecil-sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulphate*, SDS,  $> 99\%$ ), tris-base provenientes da Sigma, e DTT (99%) proveniente da GE Healthcare, a segunda solução continha 2-iodoacetamida (com grau ideal para síntese) da Merck, ao invés de DTT.

Os géis de poliácridamida bidimensionais foram realizados com uma solução de 30%:3% acrilamida:Bis, Tetrametietilediamina (*TEtraMethylEthyeneDiamine*, TEMED, 99%) e persulfato de amónia (PSA, 98%) provenientes da GE Healthcare, SDS ( $\geq 99\%$ ) e tris-base (99,9%) da Sigma, HCl (37%) proveniente da Pronalab, e isopropanol da Riedel. Os géis foram corados e descorados em soluções que continham etanol (*ethanol*, 96%) da Scarlab, sulfato de alumínio hexacahidratado (*aluminum sulfate hexahydrate*,  $\geq 95\%$ ) proveniente da Sigma, ácido ortofosforico (*orthophosphoric acid*, 85%) e azul brilhante de coomassie (*Coomassie Brilliant Blue G250*, CBB G25), com grau de pureza ideal para eletroforese), adquiridos à Merck.

Todas as soluções foram preparadas com água de pureza A provenientes de sistemas *Millipore MilliQ* (resistividade  $> 18,5 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ , a  $25^{\circ}\text{C}$ ).

## 2.2. Equipamentos

Os meios de cultura foram esterilizados na autoclave *Uniclave 88* e as células foram crescidas no agitador orbital da LAB Companion modelo SKC-6200 a  $30^{\circ}\text{C}$ . A recolha das células foi efetuada na centrífuga *Avanti J-25* (Rotor *JA-10*) da Beckman.

A separação dos metabolitos foi realizada num aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) da marca Dionex, modelo Ultimate 3000 com um detetor de fotodíodos (*Diode array detector*, DAD) com uma coluna semi preparativa,  $100 \text{ \AA}$ , da marca Phenomenex, modelo Luna ( $250 \times 100 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ).

A densidade ótica utilizada para os ensaios biológicos foi medida num espectrofotómetro Ultrospec™ 3100 pro UV/Visible.

A homogeneização das células foi realizada no homogeneizador *Potter-Elvehjem* da *Multifix*, posteriormente lisadas numa prensa francesa (*French Press*, *Thermo-FA-080A*) e centrifugadas na centrífuga *Sigma 3K30* (rotor Nr 12156).

Para a quantificação da amostra foi utilizado o espectrofotómetro *Shimadzu*, modelo *UV-180*.

A focagem isoeletrica foi realizada no sistema *Ettan IPGphor 3* da *GE Healthcare*. Para o equilíbrio das *strips* foi necessário a utilização de um agitador basculante (*Rocking Platform*) da VWR. Os géis 2D foram polimerizados no *caster* da *Hoefer* 600 e foram corados e descorados num agitador orbital *Certomat®S*. Por fim, a digitalização dos géis foi realizada no digitalizador *ImageScanner*, modelo UTA-1100 da marca *GE Healthcare*.

## 2.3. Crescimento celular

As actinobactérias foram isoladas e purificadas a partir de sedimentos marinhos recolhidos no arquipélago da Madeira no âmbito do projeto “Tesouros Oceânicos” referencia PTDC/QUI-QUI/119116/2010. As estirpes estudadas foram a PTM-346 e PTM-398, ambas pertencentes à espécie *Streptomyces aculeolatus*.

As bactérias foram crescidas a  $30^{\circ}\text{C}$  em meio A1 (descrito na Tabela 2.1) e esterilizado na autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$ , durante 20 minutos. Realizou-se um pré-inoculo de 50 mL para cada estirpe, antes do crescimento de 1 L, a partir do qual as células e os crudes foram recolhidas, após uma semana do início do crescimento (correspondente à fase estacionária). A recolha das células foi efetuada por centrifugação a  $10000 \times g$  ( $10 - 14^{\circ}\text{C}$ , 15 minutos). O *pellet* obtido foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A recolha do crude foi efetuada por uma extração líquido-líquido com acetato de etilo, seguida de evaporação da fase orgânica à secura.

**Tabela 2.1** - Composição do meio de cultura A1 (1 L).

Reagente	Quantidade
Água do mar filtrada	750 mL
Água destilada	250 mL
Amido	10 g
Extrato Levedura	4 g
Peptona	2 g

## 2.4. Separação dos metabolitos secundários

De modo a isolar e purificar os metabolitos secundários produzidos pela estirpe PTM-398 utilizaram-se duas técnicas cromatográficas: Cromatografia em coluna *flash* e a Cromatografia líquida de alta eficiência

### 2.4.1. Cromatografia em coluna *flash*

Para o fracionamento dos crudes realizou-se, uma cromatografia *flash* em sílica de fase normal (230-400 *mesh*), numa coluna com 2,5 cm de diâmetro, com o seguintes gradiente de eluição: isooctano/acetato de etilo (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 e 0:100) e metanol/acetato de etilo (10:90, 50:50 e 100:0).<sup>67</sup> Através desta técnica obtiveram-se 9 frações com polaridades crescentes.

### 2.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Posteriormente utilizaram-se as frações obtidas no ponto 2.4.1 de modo a isolar os compostos. Para tal utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por DAD. Nesta técnica cromatográfica utilizou-se uma coluna semi-preparativa C<sub>18</sub> (250 × 100 mm, 5 µm), com caudal de 1,5 mL/min com diversos gradientes de acetonitrilo/água onde se adicionou 0,1% de TFA. As condições de eluição para cada fração encontram-se apresentadas nas Tabelas 2.2 a 2.7.

**Tabela 2.2** – Condições utilizadas no HPLC para a separação dos compostos da estirpe PTM-398 frações F2+F3+F4.

Tempo (min.)	% ACN/ 0,1% TFA
0	60
60	60
61	90
90	90
100	100
110	100

**Tabela 2.3** - Condições utilizadas no HPLC para a separação dos compostos da estirpe PTM-398 frações F5+F6.

<b>Tempo (min.)</b>	<b>% ACN/ 0,1% TFA</b>
<b>0</b>	25
<b>30</b>	25
<b>31</b>	55
<b>65</b>	55
<b>66</b>	65
<b>120</b>	65
<b>121</b>	100
<b>150</b>	100

**Tabela 2.4** - Condições utilizadas no HPLC para a separação dos compostos da estirpe PTM-398 frações F7\_F1.

<b>Tempo (min.)</b>	<b>% ACN/ 0,1% TFA</b>
<b>0</b>	10
<b>15</b>	10
<b>16</b>	15
<b>45</b>	15
<b>46</b>	20
<b>75</b>	20
<b>76</b>	35
<b>105</b>	35
<b>106</b>	100
<b>135</b>	100

**Tabela 2.5** - Condições utilizadas no HPLC para a separação dos compostos da estirpe PTM-398 frações F7\_F2.

<b>Tempo (min.)</b>	<b>% ACN/ 0,1% TFA</b>
<b>0</b>	50
<b>55</b>	50
<b>56</b>	70
<b>85</b>	70
<b>86</b>	80
<b>115</b>	80
<b>116</b>	100
<b>125</b>	100



**Tabela 2.6** - Condições utilizadas no HPLC para a separação dos compostos da estirpe PTM-398 frações F8+F9\_F1.

Tempo (min.)	% ACN/ 0,1% TFA
0	10
15	10
16	15
45	15
46	20
75	20
76	35
105	35
106	100
135	100

**Tabela 2.7** - Condições utilizadas no HPLC para a separação dos compostos da estirpe PTM-398 frações F8+F9\_F2.

Tempo (min.)	% ACN/ 0,1% TFA
0	50
55	50
56	70
85	70
86	80
115	80
116	100
135	100

## 2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos isolados da estirpe PTM-398

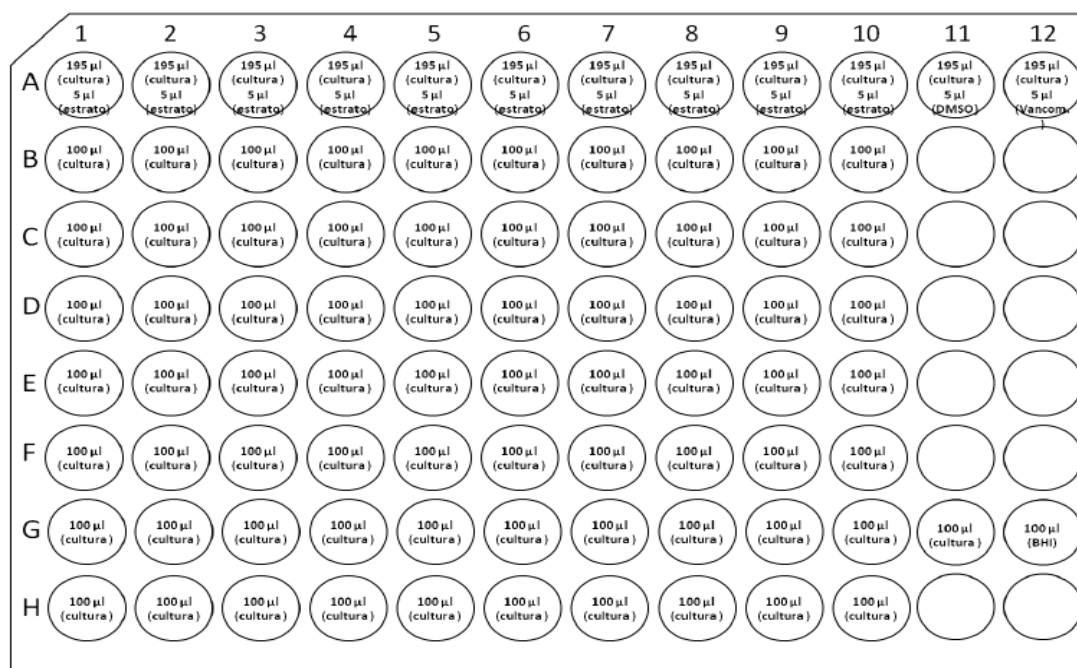
Os compostos isolados foram testados contra duas estirpes bacterianas multirresistentes: *Enterococcus faecium* EF82 resistente à vancomicina (VRE, “*Vancomycin resistant*” *Enterococcus faecium* EF82<sup>68</sup>) e *Staphylococcus aureus* COL resistente à metilicina (MRSA, “*Methicillin resistant*” *S. aureus* COL<sup>69</sup>) de modo a encontrar o seu valor da concentração mínima inibitória (*minimum inhibitory concentration*, MIC). Para tal, adicionou-se 5 mL em 2 tubos *falcon* de meio BHI onde foram inoculadas as estirpes, *overnight*, a 37 °C. As densidades óticas (DO) foram medidas a 600 nm, sendo os valores considerados adequados entre 0,04 e 0,06.

Distribuiu-se por uma placa de 96 poços (Figura 2.1) a cultura com o DO no valor adequado, os compostos isolados, a solução de vancomicina (1 mg/mL) para controlar a inibição do crescimento celular na estirpe MRSA e resistência da estirpe VRE, e o DMSO de modo a controlar a viabilidade da cultura na ausência dos compostos. Utilizou-se ainda meio BHI, para controlar a esterilidade e cultura celular, de modo a controlar a propagação da mesma.

Após o preenchimento dos poços procedeu-se às diluições. Para tal, foram retirados 100 µL da fila A, diluiu-se e ressuspendeu-se na fila B, procedeu-se deste modo sucessivamente até a fila

H obtendo-se um fator de diluição dos compostos isolados que varia desde  $2,5 \times 10^{-1}$ ,  $1,3 \times 10^{-2}$ ,  $6,3 \times 10^{-2}$ ,  $3,1 \times 10^{-2}$ ,  $1,6 \times 10^{-2}$ ,  $7,8 \times 10^{-3}$ ,  $3,9 \times 10^{-3}$ , a  $1,95 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , da fila A à fila H, respetivamente. As placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$ , durante 24 horas. Para avaliar a concentração mínima inibitória (MIC) de cada composto, observou-se a diferença de turbidez da cultura em cada poço em comparação com o poço que continha apenas cultura (G11) e com o poço que continha meio BHI (G12).

Considerou-se como valor de MIC de cada composto testado a concentração mínima do composto para o qual não se observou crescimento de cultura bacteriana. Esta determinação é apenas preliminar e meramente indicativa pelo que não se procedeu à realização de triplicados.



**Figura 2.1** - Ilustração da avaliação antimicrobiana dos compostos isolados da estirpe PTM-398 efetuada contra as bactérias patogénicas MRSA COL e VRE EF82. Respetivos volumes das culturas bacterianas, compostos isolados, solução de DMSO e solução de vancomicina colocados nas placas de 96 poços.

## 2.6. Eletroforese bidimensional

### 2.6.1. Preparação da amostra

As células foram homogeneizadas na presença de inibidores de proteases (concentração final de  $0,02 \text{ mg/mL}$ ), DNaseI e RNaseI (concentração final de  $0,01 \text{ mg/mL}$ ). De seguida, procedeu-se à lise celular numa prensa francesa a cerca de  $16000 \text{ psi}$ . Por último, de modo a remover detritos celulares, foi realizada uma centrifugação a baixa velocidade ( $8000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 15 minutos). Reservou-se em alíquotas a  $-80^\circ\text{C}$ .

### 2.6.2. Quantificação da proteína

A quantificação da proteína total das células (estirpe PTM-346 e PTM-398) foi realizada com o kit *BioRad Protein Assay* que tem como base o método de *Bradford*, o qual utiliza o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Este corante que apresenta um máximo de absorvância de 465 nm, o qual muda para 595 nm quando se liga a resíduos de aminoácidos básicos e aromáticos, especialmente a arginina. Assim, a concentração da proteína é proporcional à absorvância a 595 nm. A albumina do soro Bovino (*bovine serum albumin, BSA*) (GE Healthcare) foi usada como solução padrão de proteína.

### 2.6.3. Reidratação das *strips*

Antes do passo da reidratação, as amostras foram tratadas com um protocolo de precipitação com TCA e acetona gelada. Este passo teve como objetivo eliminar interferentes (maioritariamente sais) responsáveis pelo aumento da condutividade da amostra.

As tiras de gel de poliacrilamida [*strips* de IPG (*Immobilized pH Gradient*)] de 11 cm com gradientes de pH imobilizados entre 4-7, foram reidratadas *overnight* numa solução de reidratação contendo ureia (7 M), tioureia (2 M), CHAPS (4%), tampão IPG (1,5%), azul bromofenol (0,002%), DTT (0,28%) e 200 µg de amostra.

### 2.6.4. 1ª Dimensão - Focagem isoeletrica

Após a reidratação das *strips* IPG, foi realizada a focagem isoeletrica a 20°C, com um programa de 4 passos:

- 1º: voltagem constante de 500 V (1 hora, 500 Vh)
- 2º: gradiente de voltagem de 500 V até 1000 V (1 hora e 5 minutos, 800 Vh)
- 3º: gradiente de voltagem de 1000 V até 6000 V (2 horas e 30 minutos, 8800 Vh)
- 4º: Voltagem constante de 6000 V (30 minutos, 2900 Vh)

Obteve-se assim um total de 13 kV, corridos em 5 horas e 5 minutos.

### 2.6.5. Equilíbrio das *strips* de IPG

Após a 1ª dimensão, foi necessário preparar as *strips* de IPG para a 2ª dimensão. Para tal, estas foram sujeitas a dois passos de equilíbrio: Primeiro, foram mergulhadas numa solução de equilíbrio [ureia (6 M), Tris-base-HCl pH 8,8 (50 mM), glicerol (30%), SDS (2%) e azul bromofenol (0,002%) com DTT (10 mg/mL)], durante 10 minutos, sob agitação basculante. No segundo passo, foram incubadas na mesma solução, mas com 2-iodoacetamida (25 mg/mL), durante 10 minutos, sob agitação basculante.

### 2.6.6. 2ª Dimensão - SDS PAGE

A segunda dimensão foi efetuada em géis de poliacrilamida (16 x 16 cm) num sistema de eletroforese da *Hoefler* (600). O gel foi preparado com 0,375 M de Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 12,5% de acrilamida:bis, 0,2 % SDS, 0,05% de TEMED e 0,04% de PSA. As *strips* foram colocadas no topo do gel e os vidros foram selados com 1% solução de agarose em tampão de corrida (0,025 M de Tris-base, 0,192 M de glicina e 0,2% de SDS). A eletroforese foi realizada a uma voltagem de 80 V durante meia hora, de modo a ocorrer a migração das proteínas da *strip* de IPG para o gel de poliacrilamida. De seguida, deixou-se correr a 250 V durante aproximadamente 3 horas.

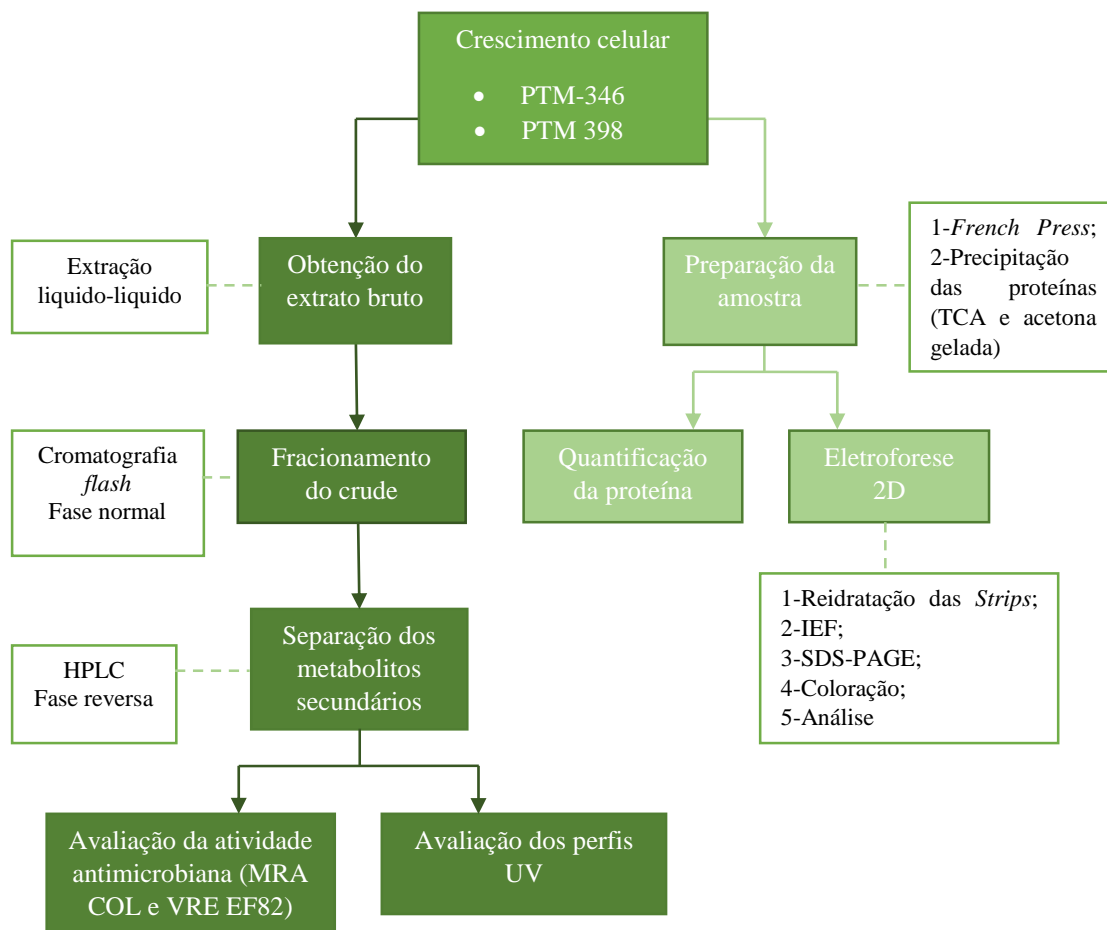
### 2.6.7. Coloração

No fim da eletroforese, os géis foram lavados três vezes em água destilada durante 10 minutos de cada vez e corados *overnight* com azul coomassie coloidal [0,02% (m/v) de CBB G250, 5% (m/v) de sulfato de alumínio, 10% (v/v) de etanol e 2% (v/v) de ácido ortofosfórico]. Posteriormente, os géis foram novamente lavados com água destilada, durante 5 minutos, sob agitação. No fim das lavagens os géis foram incubados numa solução de descoloração (*Destainig solution* constituído por: 10% (v/v) etanol e 2% (v/v) de ácido ortofosforico), durante 2 horas. Por fim, foram lavados e reservados numa solução de cloreto de sódio 1 M (*sodium chloride*, NaCl).

### 2.6.8. Análise dos géis 2D

Após a digitalização dos géis procedeu-se à análise das imagens e à validação estatística das abundâncias relativas de proteínas dos géis através do *software Melanie 7.0.6* da GeneBio. O valor do *spot* foi definido a partir do seu volume, ou seja, foi calculado com base em 75% da altura máxima do *spot*. Visto que o volume depende da calibração de intensidade do pixel em cada gel, foi antes utilizado o volume relativo. O volume relativo é um valor normalizado que considera o volume do *spot* em relação a todos os *spots* da imagem. Deste modo, o volume relativo mantém-se independente das variações que possam ocorrer devido a diferentes quantidades de proteína aplicada no gel, ou de efeitos na sua coloração. De seguida, foi realizado o emparelhamento entre os géis (*matching*) que permitiu comparar as imagens e encontrar *spots* correspondentes, isto é, *spots* que representassem a mesma proteína. Para a validação estatística, foi determinado um valor de razão de variação (*fold change*) entre a média dos volumes relativos dos *spots* em cada classe. Considerou-se então que caso a razão da variação fosse superior a 2 e o *p-value* menor que 0,05, as proteínas são expressas diferencialmente nas duas estirpes analisadas (PTM-346 e PTM-398).

Na Figura 2.2 encontra-se representado um esquema que resume, a obtenção, separação e análise dos compostos isolados, assim como a obtenção e análise de cada proteoma, desde a recolha das células até à análise das imagens dos géis.



**Figura 2.2** - Fluxograma do trabalho experimental desenvolvido. A verde escuro observa-se o trabalho realizado para a obtenção dos compostos isolados da estirpe PTM-398 e a verde claro pode-se observar o trabalho realizado para a obtenção dos perfis proteicos das duas estirpes em estudo (PTM-346 e PTM-398). As caixas a branco indicam as técnicas e metodologias usadas em cada passo.



## **Capítulo 3 – Resultados e discussão**





### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Atividades biológicas dos crudes das estirpes PTM-346 e PTM-398

Numa primeira fase, foram realizados os crescimentos das estirpes PTM-346 e PTM-398 de modo a estudar as atividades biológicas dos crudes (obtidos por extração líquido-líquido) (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1** – Atividades biológicas dos crudes das estirpes *S. aculeolatus* PTM-346 e PTM-398.

	Atividades
<b>PTM-346</b>	Antibacteriana MRSA (125 µg/mL) e VRE (3,91 µg/mL) Antiviral (vírus influenza) Antibiofilme ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) Antifouling (larva de mexilhão- <i>Mytilus galloprovincialis</i> )
<b>PTM-398</b>	Antibacteriana VRE (31,25 µg/mL)

A estirpe PTM-346 foi analisada anteriormente neste grupo de investigação. Deste modo, os resultados obtidos serão referidos no ponto 3.2.2.1. de modo a que se possa comparar as duas estirpes.

##### 3.1.1. Fracionamento do crude da estirpe PTM-398

O crude da estirpe PTM-398 foi separado em 9 frações através da técnica de cromatografia *flash* fase normal. Essas frações foram testadas de modo a avaliar a sua atividade antimicrobiana contra bactéria patogénicas MRSA e VRE (Tabela 3.2). Para tal, definiu-se os *cutoffs* dos valores MIC para as frações e para os compostos isolados, considerando-se que a atividade é elevada quando a  $MIC \leq 10 \mu\text{g/mL}$ , a atividade é moderada quando a MIC se encontra entre 10 - 50 µg/mL, e a atividade é baixa para valores de  $MIC \geq 50 \mu\text{g/mL}$ .<sup>70</sup> Na avaliação das atividades antimicrobianas dos crudes os *cutoffs* dos valores MIC são mais elevados, pois estes contêm uma mistura complexa de compostos.<sup>71</sup>

**Tabela 3.2** – Massas das frações da estirpe *S. aculeolatus* PTM-398 obtidas após a separação por cromatografia *flash* fase normal com um gradiente de eluentes isooctano/acetato de etilo e metanol/acetato de etilo com as respetivas atividades antimicrobinas contra MRSA COL e VRE EF82.

PTM-398	Massa (mg)	MIC (µg/mL)	
		MRSA COL	VRE EF82
F1	1,00	-	-
F2	2,90	n.a.	n.a.
F3	20,60	1,95	7,81
F4	118,0	3,91	7,81
F5	64,40	15,60	15,60
F6	80,90	7,81	3,91
F7	116,00	62,50	62,50
F8	100,70	250,00	31,30
F9	17,60	n.a.	125,00

- não testado, n.a. não ativo

A fração F3 apresenta uma atividade antimicrobiana elevada, sendo a fração com atividade mais elevada contra MRSA, seguindo-se as frações F4, F6. Por sua vez, a fração F5 apresenta uma atividade moderada, e as frações F7 e F8 contêm baixa atividade antimicrobiana. Relativamente à atividade antimicrobiana contra VRE EF82 a fração F6 exibe alta atividade, sendo a melhor fração, seguindo-se das frações F3 e F4. As frações F5 e F8 apresentam atividades moderadas, e por fim as frações F7 e F9 contêm baixa atividade.

Na Tabela 3.1 encontram-se indicadas as atividades referentes ao crude das duas estirpes em estudo. Relativamente à estirpe PTM-398 é possível verificar que esta apenas apresenta atividade contra VRE, ao contrário do que é demonstrado nas atividades das frações, onde a F3 apresenta uma elevada atividade contra MRSA COL, sendo mesmo superior às atividades obtidas contra VRE EF82. Tal poderá dever-se ao facto de o(s) composto(s) responsável(eis) pela atividade estar(em) mais concentrado(s) na fração que no crude.

Assim, de modo a entender quais os compostos que poderiam ser responsáveis por estas atividades procedeu-se ao seu isolamento a partir das frações pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com uma coluna de fase reversa.

### 3.2. Isolamento dos compostos da estirpe PTM-398 por cromatografia líquida de alta eficiência

Pela Tabela 3.2 verificou-se que nem todas as frações continham massa suficiente para posterior isolamento dos compostos por HPLC e, como tal, decidiu-se descartar a F1, juntar a F2+F3+F4, a F5+F6 e a F8+F9, enquanto a F7 foi isolada sem ser combinada com qualquer outra. No início do isolamento dos compostos verificou-se que as frações F7 e F8+F9 continham compostos com polaridades bastante distintas. Como tal, estas frações foram separadas em duas F7\_F1; F7\_F2 e F8+F9\_F1; F8+F9\_F2 onde na primeira fração recolhida ficaram retidos os compostos mais polares e, na segunda frações os mais apolares.

Os compostos existentes nas frações da estirpe PTM-398 foram isolados por HPLC de fase reversa, conforme descrito no capítulo 2.4.2. Os cromatogramas de HPLC com os compostos isolados em destaque encontram-se em anexo (anexo 1).

**Tabela 3.3** - Número de compostos isolados em cada fração da estirpe *S.aculeolatus* PTM-398, obtidos por HPLC de fase reversa com um gradiente de eluentes acetonitrilo com 0,1% TFA e água com 0,1% de TFA, com um caudal de 1,5 mL/min. Volume de injeção de 200µL.

PTM-398	Compostos isolados
<b>F2+F3+F4</b>	26
<b>F5+F6</b>	31
<b>F7_F1</b>	26
<b>F7_F2</b>	30
<b>F8+F9_F1</b>	17
<b>F8+F9_F2</b>	34
<b>Total</b>	164

Pela análise da Tabela 3.3 verifica-se que a fração que inclui o maior número de compostos isolados é a F8+F9\_F2 seguida da F5+F6 e F7\_F2; das frações F2+F3+F4 e da F7\_F1 foram isolados o mesmo número de metabolitos secundários e o menor número de compostos isolados corresponde à fração F8+F9\_F1. No total, da estirpe PTM-398 foram isolados 164 compostos.

### 3.2.1. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana da estirpe PTM-398

Os compostos isolados por HPLC foram submetidos a testes antimicrobianos de modo a avaliar a sua atividade contra duas bactérias patogénicas multirresistentes MRSA COL e VRE EF82. (Tabela 3.4)

**Tabela 3.4** - Quantidade de compostos isolados por HPLC de fase reversa da estirpe *S.aculeolatus* PTM-398, número de compostos avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana e quantidade de compostos com atividade antimicrobiana.

PTM-398	Compostos isolados	Compostos testados	Compostos com atividade antimicrobiana
<b>F2+F3+F4</b>	26	24	11
<b>F5+F6</b>	31	28	16
<b>F7_F1</b>	26	24	15
<b>F7_F2</b>	30	25	14
<b>F8+F9_F1</b>	17	14	1
<b>F8+F9_F2</b>	34	23	9
<b>Total</b>	164	138	66

Dos 164 compostos isolados, apenas 138 foram testados individualmente, pois alguns destes não apresentavam massa suficiente para realização dos ensaios microbianos. Entre os compostos testados, 66 apresentaram atividade antimicrobiana, quer contra MRSA COL, quer contra VRE EF82. A fração F5+F6 apresenta-se como a fração que contém mais compostos com atividade antimicrobiana.

Na Tabela 3.5 pode-se observar os dados relativos aos dois compostos que apresentaram atividades antimicrobianas mais elevadas e as respectivas massas. Os valores MIC de todos os compostos testados encontram-se em anexo (anexo 2).

**Tabela 3.5** – Metabolitos secundários isolados por HPLC de fase reversa com melhor atividade contra as bactérias patogênicas MRSA e VRE, e respectivas MIC e massas.

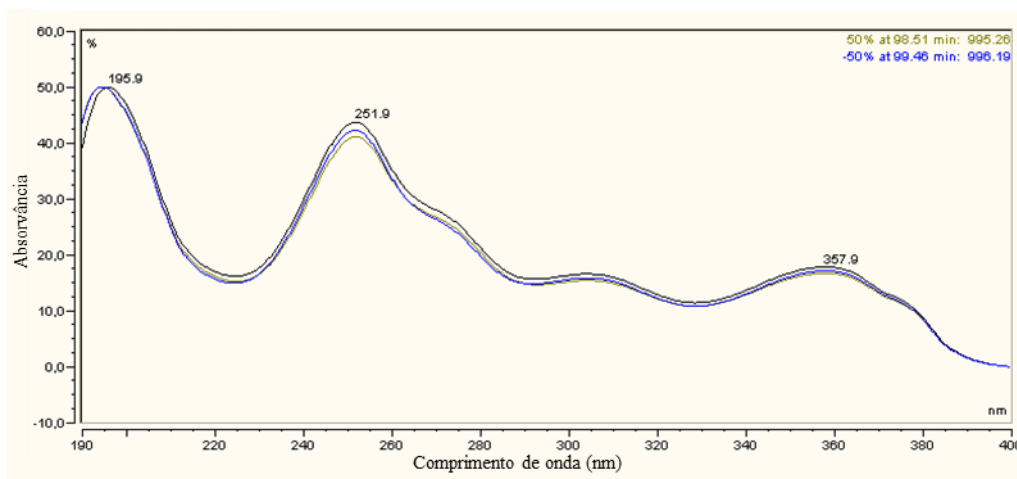
Amostra	Massa (mg)	MIC (µg/mL)	
		MRSA COL	VRE EF82
<b>F5+F6_F93</b>	2,34	7,81	7,81
<b>F8+F9_F2_F75</b>	0,76	15,6	3,91

Em geral, os metabolitos produzidos pela estirpe PTM-398 apresentam uma baixa atividade antimicrobiana contra MRSA COL e VRE EF82. Em particular os compostos da fração F7\_F1 apresentam baixa atividade antimicrobiana (250 µg/mL) contra as duas bactérias patogênicas. Na fração F7\_F2 o melhor composto apresenta baixa atividade (125 µg/mL) quer contra MRSA como VRE enquanto a fração F8+F9\_F1 contém apenas um composto, sendo que este exibe baixa atividade contra VRE EF82 (250 µg/mL). Na fração F2+F3+F4 a maioria dos compostos apresenta uma atividade antimicrobiana intermédia. Apenas 2 compostos desta estirpe encontram-se dentro do intervalo de *cutoff* de atividades elevadas, o composto F5+F6\_F93 e o composto F8+F9\_F2\_F75 (Tabela 3.5). O composto F5+F6\_F93 revelou atividade antimicrobiana contra MRSA COL e VRE EF82 (7,81 µg/mL), e o composto F8+F9\_F2\_F75 apresenta a atividade mais elevada contra VRE EF82 (3,91 µg/mL).

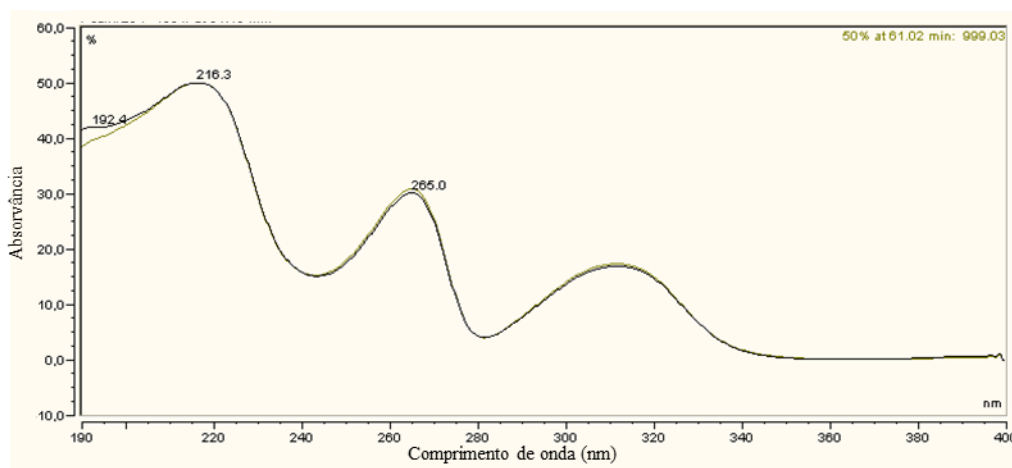
Em comparação com atividades verificadas nas frações (Tabela 3.2) a fração com maior atividade contra MRSA COL foi a F3 (1,95 µg/mL) e contra VRE EF82 foi a fração F6 (7,81 µg/mL), mas tal não se verifica quando nos compostos isolados. No caso das atividades antimicrobianas contra MRSA COL, a fração F3 apresenta uma atividade superior do que os compostos isolados, possivelmente os compostos da fração F3 têm uma ação mais eficaz em conjunto. Por sua vez, as frações F8 e F9, apresentaram baixa atividade antimicrobiana (F8-31,3 µg/mL e F9-125 µg/mL) e o composto F8+F9\_F2\_F75 (3,91 µg/mL) inibiu o crescimento de VRE EF82 mais eficazmente quando isolado dos restantes.

### 3.2.2. Detecção preliminar de isoprenóides híbridos

Como já foi referido anteriormente, a espécie *S. aculeolatus* produz tipicamente metabolitos secundários isoprenóides híbridos. Como tal, neste trabalho pretendeu-se identificar IH produzidos pela estirpe PTM-398 e PTM-346. A caracterização dos compostos foi realizada através dos perfis UV obtido pelo detetor DAD acoplado ao HPLC.



**Figura 3.1** - Espectro UV do composto F2+F3+F4\_F59 da estirpe *S. aculeolatus* PTM-398, obtido através do isolamento por HPLC fase reversa acoplado com o detetor DAD com um gradiente de eluentes acetonitrilo com 0,1% TFA e água com 0,1% de TFA, com um caudal de 1,5 mL/min. Volume de injeção de 200  $\mu$ L. O perfil UV observado indica que o metabolito secundário isolado pertence à família das napiradiomicinas.



**Figura 3.2** - Espectro UV do composto F5+F6\_F41 da estirpe *S. aculeolatus* PTM-398, obtido através do isolamento por HPLC fase reversa acoplado com o detetor DAD com um gradiente de eluentes acetonitrilo com 0,1% TFA e água com 0,1% de TFA, com um caudal de 1,5 mL/min. Volume de injeção de 200  $\mu$ L. O perfil UV observado indica que o metabolito secundário isolado pertence à família das marinonas.

Como exemplo de identificação temos a Figura 3.1 onde é possível observar o perfil UV do composto F2+F3+F4\_F59. Em comparação com a Figura 1.5, é possível determinar que este

espectro corresponde a uma napiradiomicina. Já na Figura 3.2 é visível o perfil espectrofotométrico de uma marinona pertencente ao composto F5+F6\_F41.

Estas análises foram realizadas individualmente para todos os compostos isolados por HPLC de modo a determinar a quantidade de IH são produzidas por cada fração da estirpe em estudo. (Tabela 3.6)

**Tabela 3.6** – Número total dos compostos isolados por HPLC de fase reversa acoplado com o detetor DAD. Os compostos foram isolados com um gradiente de eluentes, acetonitrilo com 0,1% TFA e água com 0,1% de TFA. O caudal foi de 1,5 mL/min e o volume de injeção de 200µL. Identificação da quantidade de IH em cada fração através dos seus perfis UV.

PTM-398	Total de compostos isolados	Napiradiomicinas	Marinonas
<b>F2+F3+F4</b>	26	13	4
<b>F5+F6</b>	31	9	2
<b>F7_F1</b>	26	0	0
<b>F7_F2</b>	30	0	3
<b>F8+F9_F1</b>	17	0	0
<b>F8+F9_F2</b>	34	0	1
<b>Total</b>	164	23	6

Na estirpe PTM-398 detetaram-se compostos pertencentes às famílias das napiradiomicinas e marinonas, mas não se detetou a presença das famílias lavanducianinas e nitropirrolinas. Através da análise da Tabela 3.6 é possível verificar que a fração F2+F3+F4 produz 13 napiradiomicinas e 4 marinonas; quanto à fração F5+F6, apresenta 9 napiradiomicinas e 2 marinonas. Dos 26 compostos isolados na fração F7\_F1, nenhum aparenta pertencer à classe IH. Na fração F7\_F2 verificou-se a produção de 3 marinonas e, no conjunto das frações F8+F9\_F1 e F8+F9\_F2 detetou-se uma marinona. Ou seja, esta estirpe apresenta uma maior produção de napiradiomicinas (23) do que de marinonas (6). Após esta avaliação foi possível relacionar os compostos com atividade antimicrobiana com as famílias de napiradiomicinas e marinonas.

**Tabela 3.7** - Identificação do número de compostos isolados por HPLC de fase reversa que apresentaram atividade antimicrobiana (contra MRSA e VRE) e identificação dos seus perfis UV.

PTM-398	Compostos com atividade antimicrobiana	Napiradiomicinas com atividade antimicrobiana	Marinonas com atividade antimicrobiana
<b>F2+F3+F4</b>	11	8	0
<b>F5+F6</b>	16	8	1
<b>F7_F1</b>	15	0	0
<b>F7_F2</b>	14	0	0
<b>F8+F9_F1</b>	1	0	0
<b>F8+F9_F2</b>	9	0	0
<b>Total</b>	66	16	1

Através da análise da Tabela 3.7 é possível concluir que dos 66 compostos com atividade antimicrobiana apenas 1 tem perfil de marinona e 16 têm perfis de napiradiomicina.

Dos compostos com elevada atividade o composto F5+F6\_F93 apresenta um perfil de napiradiomicina sendo que o composto F8+F9\_F2\_F75 não aparenta pertencer a qualquer família de IH.

### 3.2.2.1. Comparação dos isoprenoides híbridos produzidos pelas estirpes PTM-346 e PTM-398

Relativamente à estirpe PTM-346 foram realizados estudos preliminares anteriormente no grupo de investigação, pelo que não foram repetidos neste trabalho. Deste modo foi possível comparar os resultados obtidos entre as duas estirpes (Tabela 3.8).

**Tabela 3.8** – Número total de compostos isolados por HPLC de fase reversa das estirpes *S. aculeolatus* PTM-346 e PTM-398, e quantidade compostos ativos. Quantificação total de compostos pertencentes às famílias napiradiomicinas e marinonas e com atividade.

	<b>Total compostos isolados (com atividade)</b>	<b>Napiradiomicinas (com atividade)</b>	<b>Marinonas (com atividade)</b>
<b>PTM-346</b>	160 (81)	7 (6)	16 (12)
<b>PTM-398</b>	164 (66)	23 (16)	6 (1)
<b>Total</b>	324 (147)	30 (22)	22 (13)

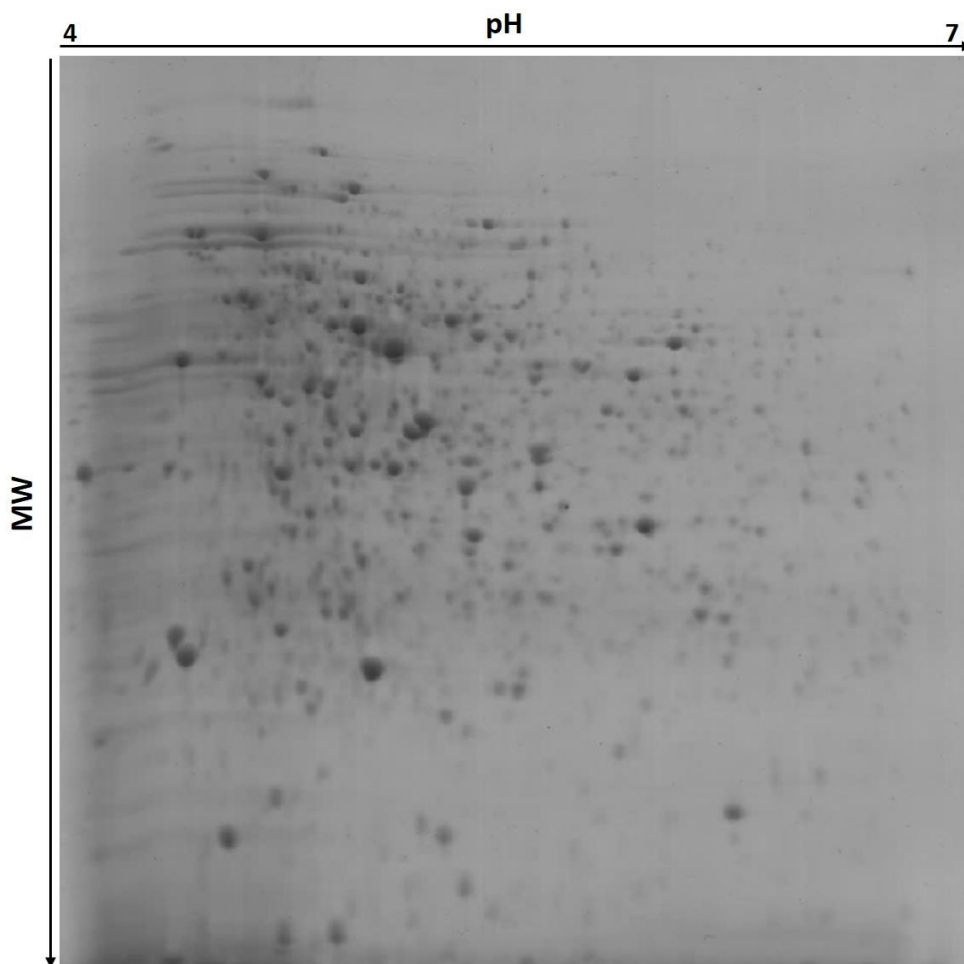
Numa análise mais detalhada, é possível verificar que as duas estirpes produzem um número semelhante de compostos, sendo que a estirpe PTM-346 contém o maior número de compostos com atividade antimicrobiana 81 contra os 66 da PTM-398. Esta informação está de acordo com as bioatividades obtidas nos crudes (Tabela 3.1) em que a estirpe PTM-346 exibe uma maior quantidade de bioatividades, nomeadamente contra MRSA e VRE, enquanto que a estirpe PTM-398 apresenta pouca bioatividade exibindo apenas atividade antimicrobiana contra VRE. Pode-se ainda constatar que a estirpe PTM-398 é maioritariamente produtora de napiradiomicinas e a estirpe PTM-346 de marinonas. O mesmo é verificado nos compostos com atividade antimicrobiana.

Em estudos anteriormente realizados no grupo de investigação foram determinadas as sequências dos genes 16S rRNA das duas estirpes. Estas sequências foram depositadas na base de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), com os seguintes números de acesso: KP869060.1 (PTM-346) e KP869063.1 (PTM-398). Tendo em conta esta informação, foi possível comparar as duas sequências através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), onde se verificou que as duas estirpes em estudo apresentam uma percentagem de identidade de 99%. No entanto, a análise filogenética destas estirpes em comparação com as estirpes do grupo MAR4, também depositadas no Genbank, indicou que poderão pertencer a filotipos distintos. A diferença da expressão de

napiradiomicinas e marinonas pode estar relacionada com este facto. Análises realizadas anteriormente por outros grupos apoiam esta teoria, uma vez que foram encontradas evidências de que os compostos produzidos pelo grupo MAR4 encontram-se aglomerados de acordo com a taxonomia da estirpe produtora.<sup>40</sup>

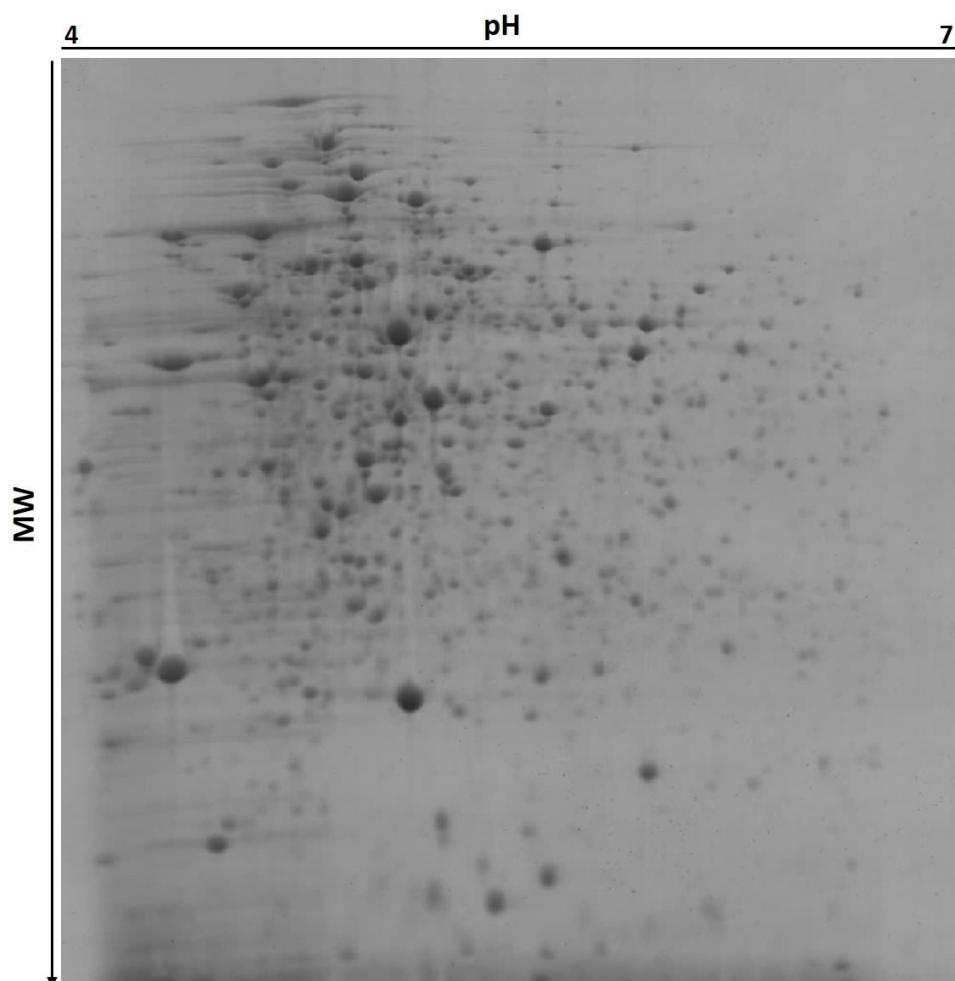
### 3.3. Eletroforese 2D

Os extratos proteicos totais das estirpes *S. aculeolatus* PTM-346 e PTM-398 foram analisados através de eletroforese bidimensional, de modo a avaliar como a expressão proteica das estirpes *S. aculeolatus* pode influenciar a biossíntese de metabolitos secundários. As células foram recolhidas na fase estacionaria, na qual a produção de metabolismos secundários é máxima. Os proteomas das estirpes encontram-se representados na Figura 3.3 e Figura 3.4.



**Figura 3.3** - Mapa de gel 2D do extrato proteico total da estirpe PTM-346. As proteínas foram separadas em *strips* de IPG de 11 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. [imagem obtida no *software* Melanie 7.0]

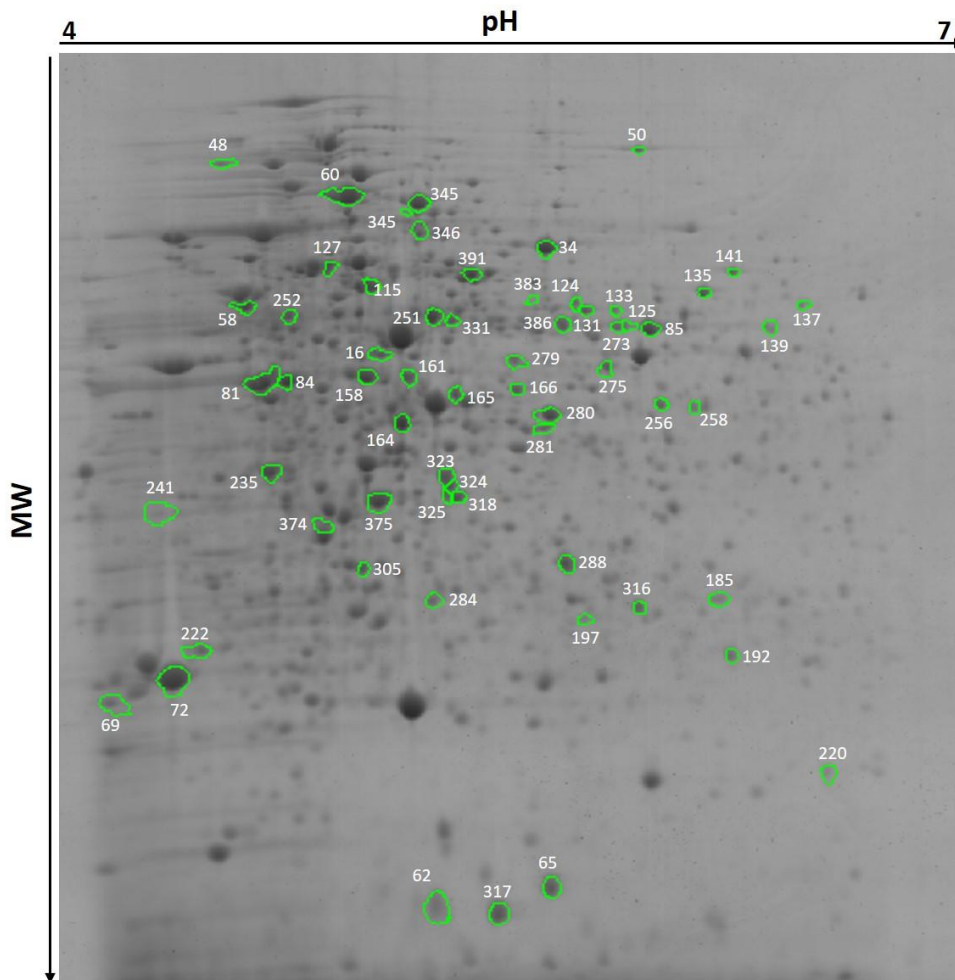




**Figura 3.4** - Mapa de gel 2D do extrato proteico total da estirpe PTM-398. As proteínas foram separadas em *strips* de IPG de 11 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. [imagem obtida no *software Melanie 7.0*]

As imagens dos géis foram analisadas pelo *software Melanie 7.0*, verificando-se uma maior quantidade de *spots* entre a gama de pH 5-6, com massas moleculares relativas entre 50 e 75 kDa. Numa primeira análise, foram detetados 737 *spots* no gel da estirpe PTM-346 e 866 *spots* no gel da estirpe PTM-398 (valor correspondente à média de seis géis de três replicados biológicos e 2 replicados técnicos). De seguida, procedeu-se a uma análise estatística onde foram considerados diferencialmente expressos os *spots* de proteína que apresentassem uma razão de variação do volume relativo do *spot* (*fold-change*) superior a 2 e o *p-value* (ANOVA) menor que 0,05. O resumo da análise dos géis 2D encontra-se apresentado na Tabela 3.9.





**Figura 3.6** - *Spots* sobre-expressos do mapa do gel 2D do extrato proteico total da estirpe PTM-398 de acordo com os critérios *fold change* maior que 2 e ANOVA menor que 0,05. As proteínas foram separadas em *strips* de IPG de 11 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. [imagem obtida no *software Melanie 7.0*]

Esta diferença de expressão proteica observada nos géis poderá estar relacionada com as diferenças filogenéticas entre estas duas estirpes, mais especificamente pelo facto de pertencerem a filotipos diferentes (apesar de possuírem uma percentagem de identidade de 99%). É de salientar que a análise filogenética das estirpes apenas é feita ao nível do gene 16S rRNA e, que apesar da percentagem de identidade ser de 99%, o mesmo não poderá ser observado no genoma “total”. Como tal, é importante realizar a sequenciação do genoma das duas estirpes já que, de com os resultados obtidos nos estudos proteómicos se prevê diferenças significativas entre os dois genomas. Estes resultados poderão ainda indicar que a estirpe PTM-346 é mais eficiente do ponto de vista biossintético do que a PTM-398 pois, apesar de apresentar um maior número atividades biológicas contém uma menor quantidade de *spots*. Isto é, a maquinaria necessária para a produção dos metabolitos secundários da estirpe PTM-346 poderá ser menos complexa do que na estirpe PTM-398. De outra perspetiva, e considerando que as duas estirpes cresceram em condições iguais, pode ainda propor-se que a estirpe PTM-346 poderá encontrar-se no seu meio

“ideal” e, como tal, expressa apenas as proteínas necessárias para o seu metabolismo constitutivo, enquanto que a estirpe PTM-398 poderá não estar tão bem adaptada a este meio de crescimento e terá de expressar proteínas de mecanismos adicionais que garantam a sua adaptação a estas condições. As diferenças ambientais observadas nos locais onde as estirpes foram recolhidas também poderão estar relacionadas com a diferença de expressão proteica observada, uma vez que as duas estirpes foram recolhidas na Madeira, mas a diferentes profundidades (a estirpe PTM-346 foi recolhida a 14 metros de profundidade e a estirpe PTM-398 foi recolhida a 1310 metros de profundidade). Por fim, é importante referir as limitações experimentais associados à 2DE que também poderão contribuir para as diferenças observadas entre os géis. Estes incluem a composição do meio de cultura baseado em água do mar (salinidade diferente nos crescimentos celulares), o método de quantificação de proteína, a coloração com CBB (produtos excretados pelas bactérias poderão influenciar estas técnicas).

O facto o número de *spots* sobre-expressos ser maior na estirpe PTM-346 poderá estar de acordo com o maior número de bioatividades apresentada por esta estirpe. Para além disso, é presumível que estes *spots* estejam relacionados com a síntese de IH, já que a estirpe PTM-346 produz mais marinonas. Assim, é possível que os *spots* sobre-expressos observados no seu perfil proteico estejam relacionados com a biossíntese deste IH. Da mesma forma, as proteínas sobre-expressos em PTM-398 poderão estar envolvidas na produção da elevada quantidade de naporadiomicinas.

No entanto, é importante referir que os mapas 2D analisados apenas resolvem proteínas com o pI compreendido entre 4 e 7, pelo que mais diferenças poderão ser encontradas noutras janelas de pH.

À data da escrita desta tese não foi ainda possível identificar nenhuma das proteínas visualizadas nestes géis. Este trabalho irá ser realizado recorrendo a técnicas de espectrometria de massa (*peptide mass fingerprint*) por *MALDI-TOF*, (MS e MS/MS)

Tendo em conta a pesquisa bibliográfica realizada (ver capítulo 1.3.1.2), espera-se, por exemplo, identificar a via metabólica preferencial que origina os precursores IPP e DMAPP para a biossíntese dos isoprenóides híbridos: a via MVP ou a via MEPP. No primeiro, caso poderá ver-se um aumento de expressão de algumas proteínas pertencentes a essa via, como por exemplo, a HMG-CoA sintase ou mevalonato cinase (Figura 1.6 – A). Se por outro lado forem identificadas proteínas, como por exemplo, a DXP sintase ou a CDP-ME cinase (Figura 1.6 – B) é possível presumir que a obtenção do IPP e DMAPP provem da via MEPP.<sup>46,47</sup>

É ainda esperado encontrar PTases uma vez que estas são as responsáveis pela condensação sequencial dos precursores. Dependendo das extensões das cadeias dos isoprenos formadas, será possível encontrar por exemplo a proteína GDP sintase, responsável pelo alongamento da cadeia até 10 carbonos, a FDP sintase que origina a molécula FDP com 15 carbonos ou a GGDP sintase

que origina a molécula GGDP com 20 carbonos.<sup>47</sup> Dentro da família das PTases existe ainda um subgrupo as ABBA PTases que incluem as indole ABBA PTases e as Orf2 ABBA PTases. Estas também poderão ser localizadas nos perfis proteicos das estirpes estudadas, uma vez que, estão relacionadas com ligação dos isoprenóides a substratos aromáticos, como por exemplo indole, naftoquinonas e aminocumarinas.<sup>39,51</sup> Na Tabela 3.10 encontram-se descritos os pontos isoeletricos e as massas moleculares de algumas das proteínas acima referidas, de modo a facilitar a sua possível identificação.

**Tabela 3.10** - Valores dos pontos isoeletricos e massas moleculares das proteínas envolvidas nas vias biossintéticas propostas, tendo em consideração as espécies em que estavam descritos. (Informação retirada de <http://www.uniprot.org/> e <http://web.expasy.org/protparam/>)

<b>Proteína</b>	<b>pI</b>	<b>MM (kDa)</b>	<b>Espécie</b>
<b>DXP Sintase</b>	5,49	69,55	<i>S. coelicolor</i>
<b>DXP Reductoisomerase</b>	5,01	43,77	<i>S. coelicolor</i>
<b>MEP Citidiltransferase</b>	5,11	27,843	<i>S. coelicolor</i>
<b>CDP-ME Cinase</b>	4,56	29,81	<i>S. coelicolor</i>
<b>MECDP Sintase</b>	5,53	16,97	<i>S. coelicolor</i>
<b>HMBDP Sintase</b>	5,36	40,8	<i>S. coelicolor</i>
<b>HMBDP Redutase</b>	4,82	36,61	<i>S. coelicolor</i>
<b>Acetil-CoA Acetiltransferase</b>	5,84	41,22	<i>S. davawensis</i>
<b>HMG-CoA Sintase</b>	5,37	42,00	<i>S. cinnamomensis</i>
<b>Mevalonato Cinase</b>	5,89	34,74	<i>S. davawensis</i>
<b>Fosfomevalonato Cinase</b>	5,83	39,28	<i>Streptomyces sp. (estirpe CL190)</i>
<b>Disfosfato Mevalonato Descarboxil</b>	6,77	36,82	<i>S. anulatus (S.chrysomallus)</i>
<b>IPP Isomerase</b>	5,37	38,84	<i>Streptomyces sp. (estirpe CL190)</i>
<b>Difosfato de Farnesilo Sintase</b>	6,09	28,93	<i>S. thermoautotrophicus</i>
<b>Difosfato Geranilgeranilo Sintase</b>	5,67	42,07	<i>Streptomyces sp. (estirpe KO-3988)</i>

Assim, com este estudo é possível determinar as vias biossintéticas que conduzem à produção de um metabolito secundário de interesse de modo a, futuramente, recorrendo a técnicas de engenharia genética e biotecnologia, melhorar o rendimento da produção.



## **Capítulo 4 – Conclusões e perspectivas futuras**





#### 4. Conclusões e perspectivas futuras

Este trabalho dividiu-se em duas partes. Na primeira parte, os compostos bioativos das estirpes PTM-398 e PTM-346 pertencentes à espécie *Streptomyces aculeolatus* foram isolados e as suas atividades foram avaliadas por ensaios antimicrobianos. Na segunda parte deste trabalho, realizou-se uma eletroforese bidimensional de forma a identificar as proteínas envolvidas na biossíntese dos metabolitos secundários das duas estirpes.

As células das estirpes PTM 398 e PTM 346 foram crescidas a 30 °C, em condições aeróbias e durante sete dias (condições ótimas para o crescimento desta espécie). Primeiramente, as atividades dos crudes de cada estirpe foram avaliadas, tendo-se observado uma maior variedade na estirpe PTM-346. Seguidamente, o crude da estirpe PTM- 398 foi fracionado por cromatografia *flash* e obtiveram-se 9 frações, cujas atividades antimicrobianas (contra MRSA COL e VRE EF82) foram testadas. Destas frações, a F3 e a F6 apresentaram uma atividade mais elevada contra MRSA COL (1,95 µg/ml) e VRE EF82 (3,91 µg/ml), respetivamente. De modo a identificar os metabolitos secundários/compostos responsáveis por estas atividades procedeu-se ao seu isolamento por HPLC, sendo que algumas frações foram agrupadas uma vez que isoladas não possuíam massa suficiente para futura separação. Dos 164 compostos isolados, 66 apresentaram bioatividade contra MRSA COL e VRE EF82. No geral, os compostos desta estirpe apresentaram baixa atividade antimicrobiana dos quais dois demonstraram-se promissores: o F5+F6\_F93 com MIC contra MRSA COL e VRE EF82 de 7,81 µg/mL, e o F8+F9\_F2\_F75 com MIC contra VRE EF82 de 3,91 µg/mL. Através dos perfis UV dos compostos com bioatividade foi possível afirmar que 16 pertenciam à família napiradiomicina e 1 à família marinona, sendo que dos compostos com alta atividade um pertence a família napiradiomicina (F5+F6\_F93) e o outro (F8+F9\_F2\_F75) não pertence a nenhuma das famílias de IH. Relativamente à estirpe PTM-346, trabalhos realizados anteriormente neste grupo de investigação revelaram uma maior produção de marinonas do que napiradiomicinas, ao contrário da estirpe estudada neste trabalho. Esta disparidade poderá estar relacionada com as diferenças filogenéticas apresentadas por estas estirpes.

Na segunda parte deste trabalho, as células das duas estirpes foram recolhidas na fase estacionária, homogeneizadas e lisadas. Os extratos proteicos totais foram analisados por 2DE em *strips* de IPG de, 11 cm, pH 4-7. Pela análise dos géis 2D, foi possível observar-se cerca de 700 e 800 *spots* nos géis correspondentes às estirpes PTM-346 e PTM-398, respetivamente. Após uma análise estatística, foram identificados 173 *spots* diferenciais, dos quais 110 se encontravam sobre-expressos nos géis da estirpe PTM 346 e 63 nos géis da estirpe PTM-398. Para além disso, visualizou-se um elevado número de *spots* exclusivos: 345 no gel da PTM-346 e 474 na estirpe PTM-398. Especificamente, propõe-se que estas diferenças significativas observadas na expressão proteica poderão dever-se a inúmeros fatores, tais como: as estirpes pertencerem a

filotipos diferentes, diferenças não identificadas ao nível do genoma, eficiência biossintética de cada estirpe, adaptação das mesmas às condições de crescimento, condições ambientais e erros associados à técnica utilizada neste trabalho. Relativamente aos *spots* sobre-expressos, sugere-se que estes poderão estar relacionados com o número de atividades biológicas de cada estirpe.

Futuramente, pretende-se elucidar estruturalmente os compostos que apresentaram bioatividade, assim como avaliar outras bioatividades, como por exemplo: antifouling, antiviral e antibiofilme. Tenciona-se ainda sequenciar o genoma das duas estirpes em estudo. Em relação ao estudo proteico, pretende-se identificar as proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massa e, juntamente com outras técnicas entender as vias metabólicas responsáveis pela síntese destes metabolitos secundários. Um outro objetivo futuro será a continuação do estudo em outras gamas de pH (6-11), assim como a comparação de perfis proteicos com estirpes do mesmo filotipo. Para além disso, pretende-se estudar os metabolitos de origem proteica excretados pelas bactérias, o exoproteoma recorrendo à mesma técnica utilizada neste trabalho. Deste modo, poder-se-á contribuir para eventual otimização de produção destes compostos tornando o seu fornecimento viável para uma série de aplicações industriais.

## **Capítulo 5 – Referências bibliográficas**



## 5. Referências bibliográficas

1. Goodfellow, M. & Williams, S. T. Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 189–216 (1983).
2. Ventura, M. *et al.* Genomics of Actinobacteria : Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. **71**, 495–548 (2007).
3. Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. a & Fenical, W. Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5005–5011 (2002).
4. Axenov-Gibanov, D. V. *et al.* Actinobacteria Isolated from an Underground Lake and Moonmilk Speleothem from the Biggest Conglomeratic Karstic Cave in Siberia as Sources of Novel Biologically Active Compounds. *PLoS One* **11**, 1–12 (2016).
5. Subramani, R. & Aalbersberg, W. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol. Res.* **167**, 571–580 (2012).
6. Bérdy, J. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **58**, 1–26 (2005).
7. Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K. & Kim, S. K. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiol. Res.* **169**, 262–278 (2014).
8. Jensen, P. R., Mincer, T. J., Williams, P. G. & Fenical, W. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **87**, 43–48 (2005).
9. Manivasagan, P. *et al.* Marine actinobacteria: An important source of bioactive natural products. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **38**, 172–188 (2014).
10. Lam, K. S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 245–251 (2006).
11. Bull, A. T., Stach, J. E. ., Ward, A. C. & Goodfellow, M. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **87**, 65–79 (2005).
12. Bull, A. T., Ward, A. C. & Goodfellow, M. Search and discovery strategies for biotechnology: The paradigm shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 573–606 (2000).
13. Bredholdt, H. *et al.* Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord , Norway : isolation , diversity and biological activity. **9**, 2756–2764 (2007).
14. Ramesh, S. & Mathivanan, N. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal , India for antimicrobial activity and industrial enzymes. **25**, 2103–2111 (2009).
15. Castillo, U. *et al.* Scanning Electron Microscopy of Some Endophytic Streptomyces in Snakevine — *Kennedia nigricans*. *Scanning* **27**, 305–311 (2005).
16. Zhang, H., Zhang, W., Jin, Y., Jin, M. & Yu, X. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. **93**, 241–248 (2008).
17. Jensen, P. R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T. J. & Fenical, W. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ. Microbiol.* **7**, 1039–1048 (2005).
18. Helmke, E. & Weyland, H. *Rhodococcus marinonascens* sp. nov., an Actinomycete from the Sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 127–138 (1984).

19. Fenical, W. & Jensen, P. R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 666–673 (2006).
20. Olano, C., Lombó, F., Méndez, C. & Salas, J. A. Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metab. Eng.* **10**, 281–292 (2008).
21. Vijayakumar, R. *et al.* Optimization of Antimicrobial Production by a Marine Actinomycete *Streptomyces afghaniensis* VPTS3-1 Isolated from Palk Strait, East Coast of India. *Indian J. Microbiol.* **52**, 230–239 (2012).
22. Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K. & Kim, S. K. Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. *Microbiol. Res.* **168**, 311–332 (2013).
23. Kurtböke, D. I. Biodiscovery from rare actinomycetes: An eco-taxonomical perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 1843–1852 (2012).
24. Feling, R. H. *et al.* Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospira*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **42**, 355–357 (2003).
25. Ahn, K. S. *et al.* Salinosporamide A ( NPI-0052 ) potentiates apoptosis , suppresses osteoclastogenesis , and inhibits invasion through down-modulation of NF-  $\kappa$ B – regulated gene products. *BLOOD J.* **110**, 2286–2296 (2007).
26. Maloney, K. N. *et al.* Lodopyridone , a Structurally Unprecedented Alkaloid from a Marine Actinomycete. *Org. Lett.* **11**, 5422–5424 (2009).
27. Asolkar, R. N., Kirkland, T. N., Jensen, P. R. & Fenical, W. Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **63**, 37–39 (2010).
28. Khanna, M., Solanki, R. & Lal, R. Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.* **2**, 357–375 (2011).
29. Hayakawa, M. Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. *Actinomycetologica* **22**, 12–19 (2008).
30. Monciardini, P., Sosio, M., Cavaletti, L., Chiocchini, C. & Donadio, S. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**, 419–429 (2002).
31. Anderson, A. S. & Wellington, E. M. H. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 797–814 (2001).
32. Lima Procópio, R. E., Silva, I. R., Martins, M. K., Azevedo, J. L. & Araújo, J. M. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian J. Infect. Dis.* **16**, 466–471 (2012).
33. Hwang, K., Uk, H., Charusanti, P., Palsson, B. & Lee, S. Y. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* **32**, 255–268 (2014).
34. Moran, M. a, Rutherford, L. T. & Hodson, R. E. Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3695–3700 (1995).
35. Schumacher, R. W. *et al.* Isolation and structure determination of an antimicrobial ester from a marine sediment-derived bacterium. *J. Nat. Prod.* **66**, 1291–3 (2003).
36. Itoh, T., Kinoshita, M., Aoki, S. & Kobayashi, M. Komodoquinone A, a Novel Neuritogenic Anthracycline, from Marine *Streptomyces* sp. KS3. *J. Nat. Prod.* **66**, 1373–

- 1377 (2003).
37. Bruntner, C. *et al.* Frigocyclinone, a novel angucyclinone antibiotic produced by a *Streptomyces griseus* strain from Antarctica. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **58**, 346–349 (2005).
  38. Gallagher, K. a, Rauscher, K., Pavan Ioca, L. & Jensen, P. R. Phylogenetic and chemical diversity of a hybrid-isoprenoid-producing streptomycete lineage. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 6894–902 (2013).
  39. Gallagher, K. A. & Jensen, P. R. Genomic insights into the evolution of hybrid isoprenoid biosynthetic gene clusters in the MAR4 marine streptomycete clade. *BMC Genomics* **16**, 960 (2015).
  40. Gallagher, K. A., Fenical, W. & Jensen, P. R. Hybrid isoprenoid secondary metabolite production in terrestrial and marine actinomycetes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 794–800 (2010).
  41. Shomura, T. *et al.* Studies on new antibiotics SF2415 1. Taxonomy, fermentation, isolation, physicochemical properties and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **40**, 732–739 (1987).
  42. Hozzein, W. N. & Goodfellow, M. *Streptomyces synnematoformans* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a sand dune soil in Egypt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 2009–2013 (2007).
  43. Ruckert, C. *et al.* Complete genome sequence of *Streptomyces* sp. CNQ-509, a prolific producer of meroterpenoid chemistry. *J. Biotechnol.* **216**, 140–141 (2015).
  44. Fukuda, D. S. *et al.* A80915, A New Antibiotic Complex Produced by *Streptomyces Aculeolatus*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **XLIII**, (1989).
  45. Cheng, Y. Bin, Jensen, P. R. & Fenical, W. Cytotoxic and antimicrobial napyradiomycins from two marine-derived streptomyces strains. *European J. Org. Chem.* 3751–3757 (2013). doi:10.1002/ejoc.201300349
  46. Kuzuyama, T. & Seto, H. Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 171–183 (2003).
  47. Dairi, T. Studies on Biosynthetic genes and enzymes of Isoprenoids Produced by Actinomycetes. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **58**, 227–243 (2005).
  48. Lombard, J. & Moreira, D. Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 87–99 (2011).
  49. Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D. & Rohdich, F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell. Mol. life Sci.* **61**, 1401–1426 (2004).
  50. Kawasaki, T. *et al.* A relationship between the mevalonate pathway and isoprenoid. Production in actinomycetes. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **56**, 957–966 (2003).
  51. Bonitz, T., Alva, V., Saleh, O., Lupas, A. N. & Heide, L. Evolutionary relationships of microbial aromatic prenyltransferases. *PLoS One* **6**, 1–8 (2011).
  52. Wongpia, A., Mahatheeranont, S., Lomthaisong, K. & Niamsup, H. Evaluation of Sample Preparation Methods from Rice Seeds and Seedlings Suitable for Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **175**, 1035–1051 (2015).
  53. Gilmore, J. M. & Washburn, M. P. Advances in shotgun proteomics and the analysis of membrane proteomes. *J. Proteomics* **73**, 2078–2091 (2010).
  54. O’Farrell, P. H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol.*

- Chem.* **250**, 4007–4021 (1975).
55. Rabilloud, T. & Lelong, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *J. Proteomics* **74**, 1829–1841 (2011).
  56. Gorg, A. 2-D Electrophoresis. Principles and Methods. *Handbook* (2004). doi:10.1186/1755-8794-4-24
  57. Almeida, M. G., Rodrigues, C. & Lampreia, J. Proteomas : a interface entre a biologia molecular e a bioquímica das proteínas. 49–56 (2001).
  58. Gallo, G. *et al.* Differential proteomic analysis reveals novel links between primary metabolism and antibiotic production in *Amycolatopsis balhimycina*. *Proteomics* **10**, 1336–1358 (2010).
  59. Chen, Y. *et al.* A Proteomic Survey of Nonribosomal Peptide and Polyketide Biosynthesis in Actinobacteria. *J. proteome* **11**, 85–94 (2012).
  60. Bumpus, S. B., Evans, B. S., Thomas, P. M., Ntai, I. & Kelleher, N. L. A Proteomics Approach to Discovery of Natural products and Their Biosynthetic Pathways. *Nat Biotechnol* **27**, 951–956 (2009).
  61. Tocchetti, A. *et al.* A Genomic , Transcriptomic and Proteomic Look at the GE2270 Producer *Planobispora rosea* , an Uncommon Actinomycete. *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).
  62. Bagwell, C. E., Hixson, K. K., Milliken, C. E., Lopez-Ferrer, D. & Weitz, K. K. Proteomic and physiological responses of *Kineococcus radiotolerans* to copper. *PLoS One* **5**, (2010).
  63. Vandera, E., Samiotaki, M., Parapouli, M., Panayotou, G. & Koukkou, A. I. Comparative proteomic analysis of *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 on phenanthrene, phthalate and glucose. *J. Proteomics* **113**, 73–89 (2015).
  64. Li, F. *et al.* Analysis of *Streptomyces coelicolor* membrane proteome using two-dimensional native/native and native/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **465**, 148–155 (2014).
  65. Bradshaw, E., Saalbach, G. & McArthur, M. Proteomic survey of the *Streptomyces coelicolor* nucleoid. *J. Proteomics* **83**, 37–46 (2013).
  66. Choi, S. S., Kim, S. H. & Kim, E. S. Proteomics-driven identification of SCO4677-dependent proteins in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 480–484 (2010).
  67. Clark, W., Still, W. C., Kahn, M. & Mitra, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* **43**, 2923–2925 (1978).
  68. Mato, R., Lencastre, H., Roberts, R. & Tomasz, A. Multiplicity of Genetic Backgrounds among Vancomycin- Resistant *Enterococcus faecium* Isolates Recovers from an Outbreak in a New York City Hospital Multiplicity. *Microb. Drug Resist.* **2**, 309–317 (1996).
  69. Gill, S. R. *et al.* Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. *J. Bacteriol.* **187**, 2426–2438 (2005).
  70. Wang, L. *et al.* Discovering new agents active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with ligand-based approaches. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 3186–3197 (2014).
  71. Kuete, V. & Efferth, T. Cameroonian medicinal plants: Pharmacology and derived natural products. *Front. Pharmacol.* **1**, 1–19 (2010).



## **Capítulo 6 – Anexos**



## 6. Anexos

### 6.1. Anexos 1

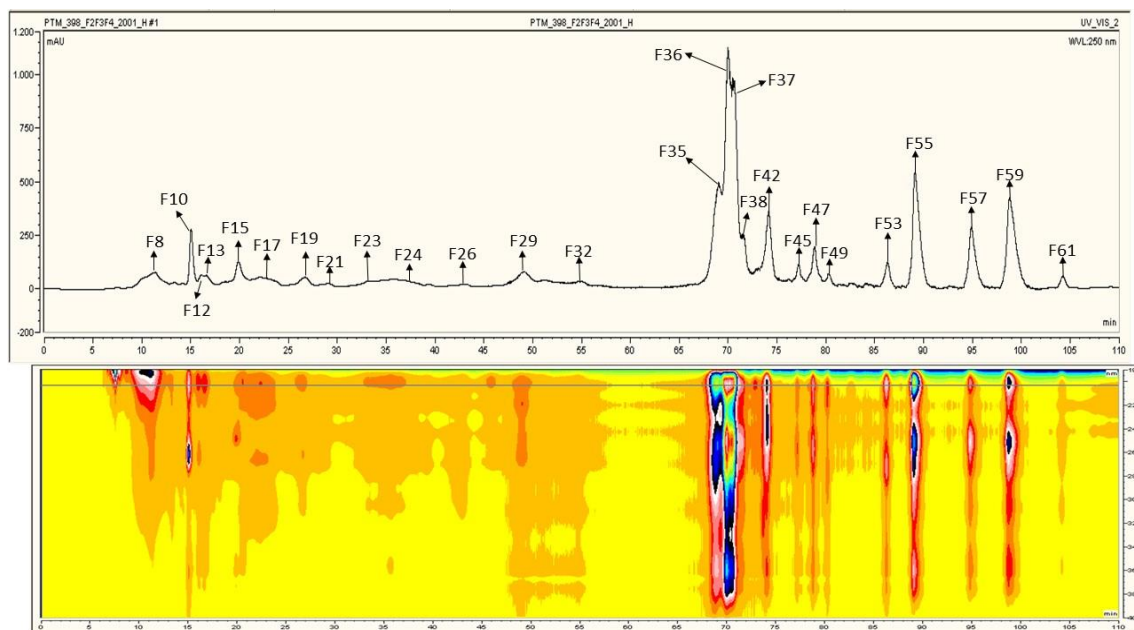


Figura 6.1- Cromatograma relativo à fração F2+F3+F4 da estirpe PTM-398.

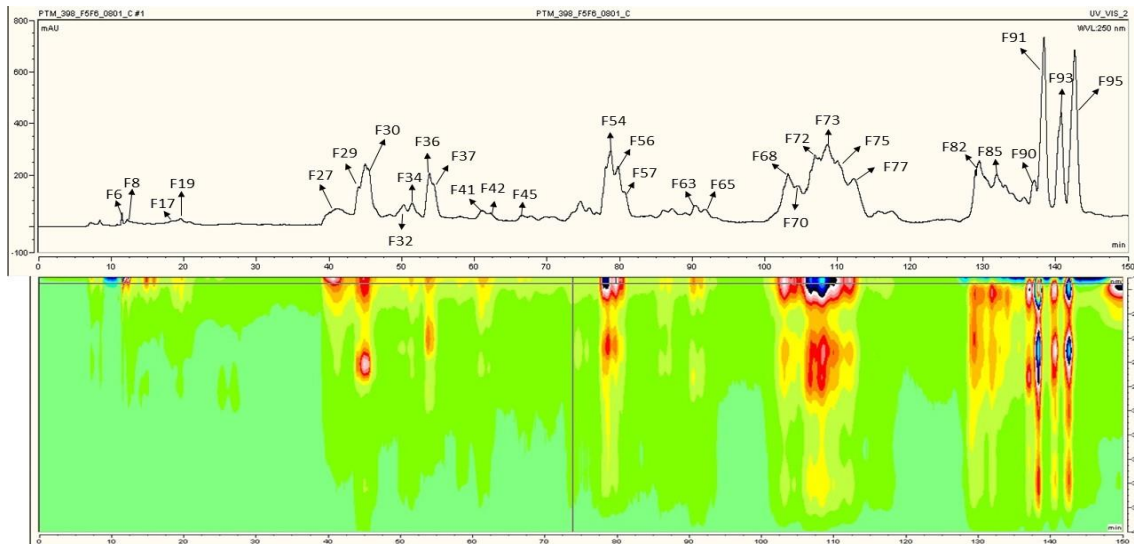
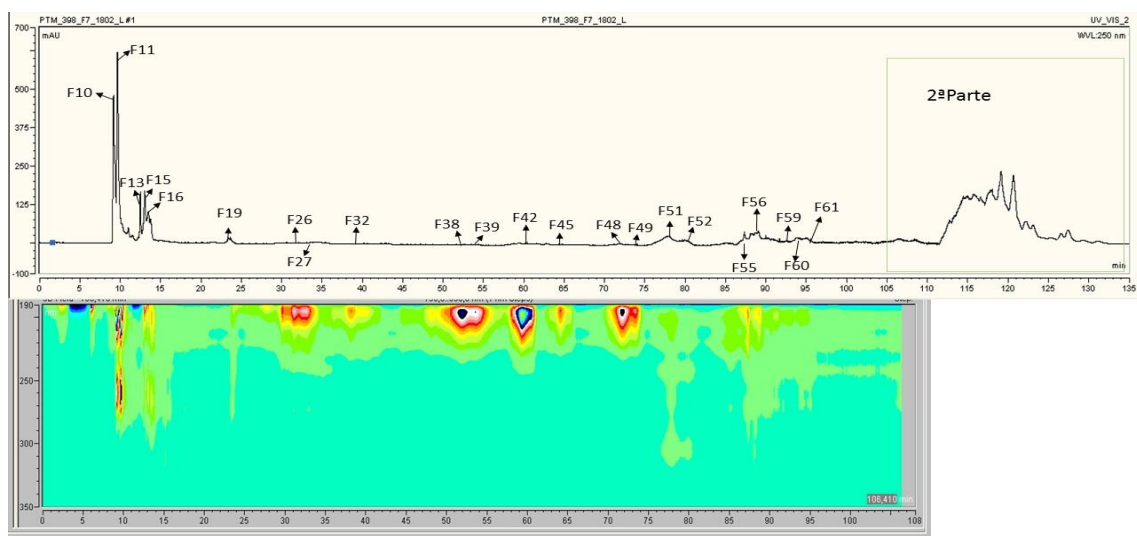
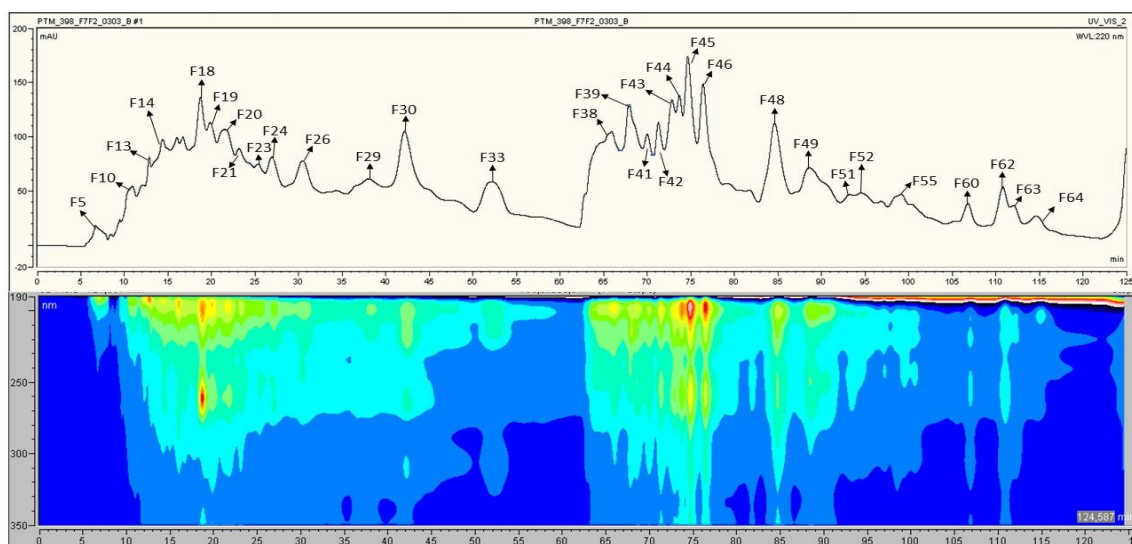


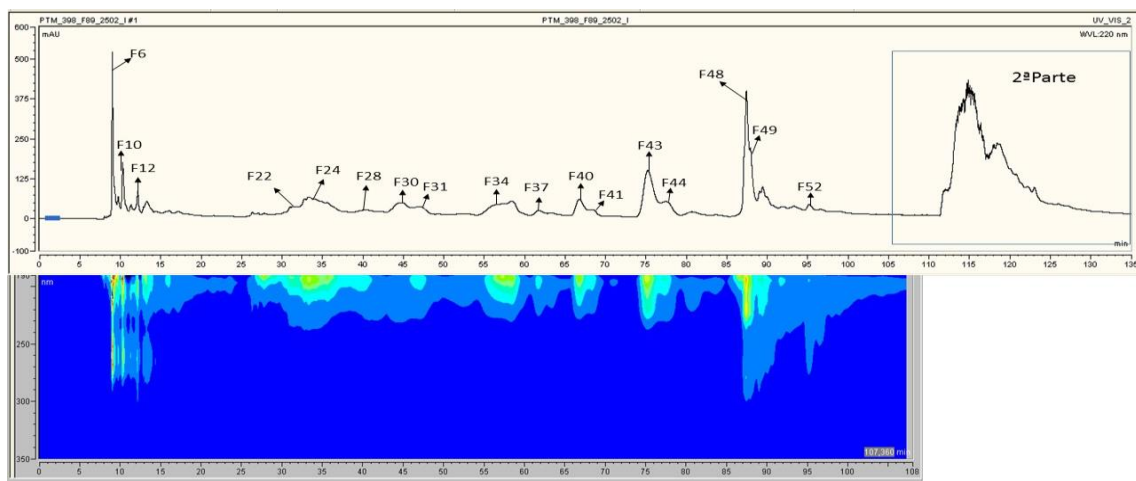
Figura 6.2 - Cromatograma relativo à fração F5+F6 da estirpe PTM-398.



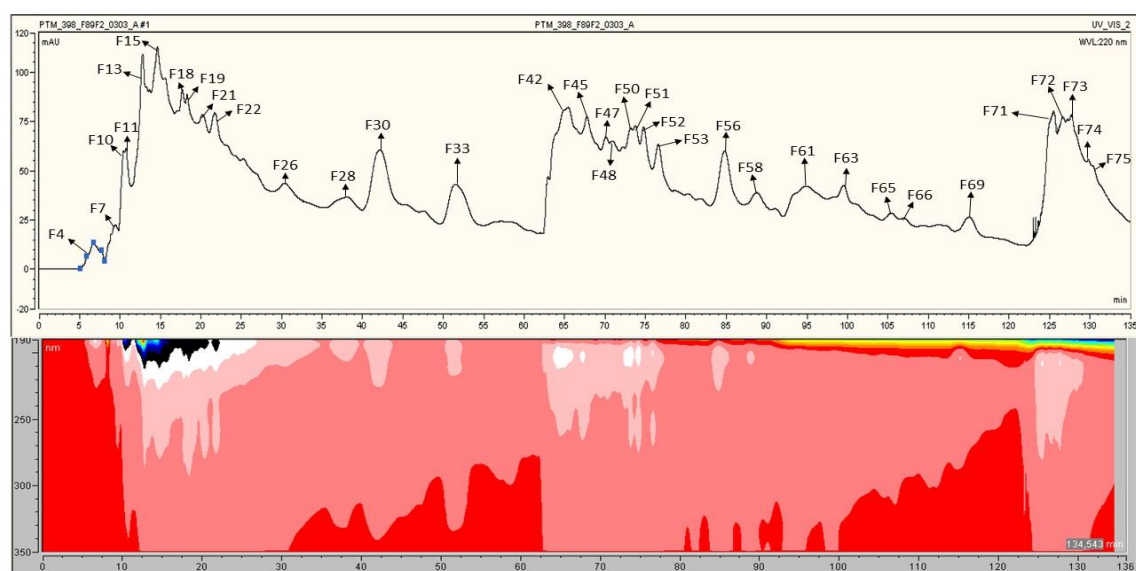
**Figura 6.3** - Cromatograma relativo à fração F7\_F1 da estirpe PTM-398.



**Figura 6.4** - Cromatograma relativo à fração F7\_F2 da estirpe PTM-398.



**Figura 6.5** - Cromatograma relativo à fração F8+F9\_F1 da estirpe PTM-398.



**Figura 6.6** - Cromatograma relativo à fração F8+F9\_F2 da estirpe PTM-398.

## 6.2. Anexo 2

**Tabela 6.1-** Massa e actividade dos compostos isolados da estirpe PTM-398 F2+F3+F4 (MIC) contra MRSA e VRE.

Amostra	Massa (mg)	MIC (µg/mL)	
		MRSA COL	VRE EF82
<b>F2+F3+F4_F8</b>	1,74	n.a.	n.a.
<b>F2+F3+F4_F10</b>	1,99	n.a.	n.a.
<b>F2+F3+F4_F12</b>	1,23	n.a.	n.a.
<b>F2+F3+F4_F13</b>	0,3	n.a.	n.a.
<b>F2+F3+F4_F15</b>	0,29	n.a.	n.a.
<b>F2+F3+F4_F17</b>	1,38	n.a.	n.a.
<b>F2+F3+F4_F19</b>	0,49	n.a.	n.a.
<b>F2+F3+F4_F21</b>	1,89	n.a.	n.a.
<b>F2+F3+F4_F23</b>	0,68	n.a.	n.a.
<b>F2+F3+F4_F24</b>	1,87	n.a.	n.a.
<b>F2+F3+F4_F26</b>	0,26	n.a.	n.a.
<b>F2+F3+F4_F29</b>	1,35	n.a.	n.a.
<b>F2+F3+F4_F35</b>	2,34	250	n.a.
<b>F2+F3+F4_F36</b>	4,84	125	n.a.
<b>F2+F3+F4_F37</b>	2,26	n.a.	250
<b>F2+F3+F4_F38</b>	1,4	125	250
<b>F2+F3+F4_F42</b>	0,41	125	62,5
<b>F2+F3+F4_F45</b>	0,47	62,5	62,5
<b>F2+F3+F4_F47</b>	0,64	31,3	62,5
<b>F2+F3+F4_F53</b>	0,43	125	125
<b>F2+F3+F4_F55</b>	1,7	31,3	125
<b>F2+F3+F4_F57</b>	1,2	31,3	62,5
<b>F2+F3+F4_F59</b>	1,63	15,6	15,6
<b>F2+F3+F4_F61</b>	2,2	n.a.	n.a.

n.a. não ativo

**Tabela 6.2** - Massa e actividade dos compostos isolados da estirpe PTM-398 F5+F6 (MIC) contra MRSA e VRE.

Amostra	Massa (mg)	MIC (µg/mL)	
		MRSA COL	VRE EF82
F5+F6_F6	0,44	n.a.	n.a.
F5+F6_F27	0,56	n.a.	250
F5+F6_F29	0,46	250	125
F5+F6_F30	0,67	n.a.	n.a.
F5+F6_F32	0,29	n.a.	n.a.
F5+F6_F34	0,41	n.a.	n.a.
F5+F6_F36	0,94	n.a.	n.a.
F5+F6_F37	0,53	n.a.	n.a.
F5+F6_F41	0,51	n.a.	250
F5+F6_F42	0,66	n.a.	n.a.
F5+F6_F45	0,69	n.a.	n.a.
F5+F6_F54	1,87	n.a.	n.a.
F5+F6_F56	0,85	n.a.	n.a.
F5+F6_F57	0,45	n.a.	250
F5+F6_F63	2,3	n.a.	n.a.
F5+F6_F65	0,47	n.a.	250
F5+F6_F68	1,56	250	n.a.
F5+F6_F70	0,88	125	250
F5+F6_F72	2,23	n.a.	n.a.
F5+F6_F73	0,96	250	125
F5+F6_F75	0,59	250	250
F5+F6_F77	0,6	250	250
F5+F6_F82	2,19	n.a.	250
F5+F6_F85	1,95	n.a.	250
F5+F6_F90	2,18	n.a.	250
F5+F6_F91	2,63	125	250
F5+F6_F93	2,34	7,81	7,81
F5+F6_F95	3,19	31,3	31,3

n.a. não ativo

**Tabela 6.3** - Massa e actividade dos compostos isolados da estirpe PTM-398 F7\_F1 (MIC) contra MRSA e VRE.

Amostra	Massa (mg)	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	
		MRSA COL	VRE EF82
F7_F1_F10	0,57	n.a.	250
F7_F1_F11	0,34	n.a.	250
F7_F1_F13	0,54	n.a.	250
F7_F1_F14	0,35	n.a.	250
F7_F1_F16	0,38	n.a.	250
F7_F1_F19	0,44	n.a.	250
F7_F1_F22	0,59	n.a.	250
F7_F1_F23	0,37	n.a.	n.a.
F7_F1_F26	0,4	n.a.	250
F7_F1_F27	1,25	n.a.	n.a.
F7_F1_F32	0,63	n.a.	250
F7_F1_F33	0,71	n.a.	250
F7_F1_F38	2,16	n.a.	n.a.
F7_F1_F39	1,03	n.a.	n.a.
F7_F1_F42	3,26	n.a.	n.a.
F7_F1_F45	0,59	n.a.	250
F7_F1_F48	1,71	n.a.	n.a.
F7_F1_F49	1,25	n.a.	n.a.
F7_F1_F51	0,88	n.a.	250
F7_F1_F52	0,73	n.a.	250
F7_F1_F56	1,34	n.a.	n.a.
F7_F1_F59	0,33	n.a.	250
F7_F1_F60	0,58	250	250
F7_F1_F61	2,91	n.a.	n.a.

n.a. não ativo



**Tabela 6.4** - Massa e actividade dos compostos isolados da estirpe PTM-398 F7\_F2 (MIC) contra MRSA e VRE.

Amostra	Massa (mg)	MIC (µg/mL)	
		MRSA COL	VRE EF82
F7_F2_F5	0,34	n.a.	250
F7_F2_F10	0,38	n.a.	250
F7_F2_F14	0,31	n.a.	250
F7_F2_F18	0,25	n.a.	250
F7_F2_F19	0,48	n.a.	250
F7_F2_F20	0,65	n.a.	250
F7_F2_F23	0,61	n.a.	250
F7_F2_F24	0,49	n.a.	250
F7_F2_F26	0,48	n.a.	250
F7_F2_F29	0,37	n.a.	n.a.
F7_F2_F30	0,65	n.a.	n.a.
F7_F2_F33	0,93	n.a.	n.a.
F7_F2_F41	0,55	n.a.	n.a.
F7_F2_F42	0,44	n.a.	n.a.
F7_F2_F43	0,67	n.a.	n.a.
F7_F2_F44	0,31	n.a.	n.a.
F7_F2_F45	0,61	n.a.	n.a.
F7_F2_F46	0,75	n.a.	n.a.
F7_F2_F48	0,94	n.a.	n.a.
F7_F2_F49	0,98	n.a.	n.a.
F7_F2_F51	0,46	n.a.	250
F7_F2_F55	0,28	n.a.	250
F7_F2_F60	0,45	250	125
F7_F2_F62	0,68	125	125
F7_F2_F64	0,76	250	250

n.a. não ativo

**Tabela 6.5** - Massa e actividade dos compostos isolados da estirpe PTM-398 F8+F9\_F1 (MIC) contra MRSA e VRE.

Amostra	Massa (mg)	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	
		MRSA COL	VRE EF82
<b>F8+F9_F1_F6</b>	0,28	n.a.	n.a.
<b>F8+F9_F1_F22</b>	0,26	n.a.	n.a.
<b>F8+F9_F1_F24</b>	0,43	n.a.	n.a.
<b>F8+F9_F1_F28</b>	0,42	n.a.	n.a.
<b>F8+F9_F1_F30</b>	0,63	n.a.	n.a.
<b>F8+F9_F1_F34</b>	0,79	n.a.	n.a.
<b>F8+F9_F1_F37</b>	0,78	n.a.	n.a.
<b>F8+F9_F1_F40</b>	0,64	n.a.	n.a.
<b>F8+F9_F1_F41</b>	0,29	n.a.	n.a.
<b>F8+F9_F1_F43</b>	0,42	n.a.	250
<b>F8+F9_F1_F44</b>	0,28	n.a.	n.a.
<b>F8+F9_F1_F48</b>	0,6	n.a.	n.a.
<b>F8+F9_F1_F49</b>	0,39	n.a.	n.a.
<b>F8+F9_F1_F52</b>	0,45	n.a.	n.a.

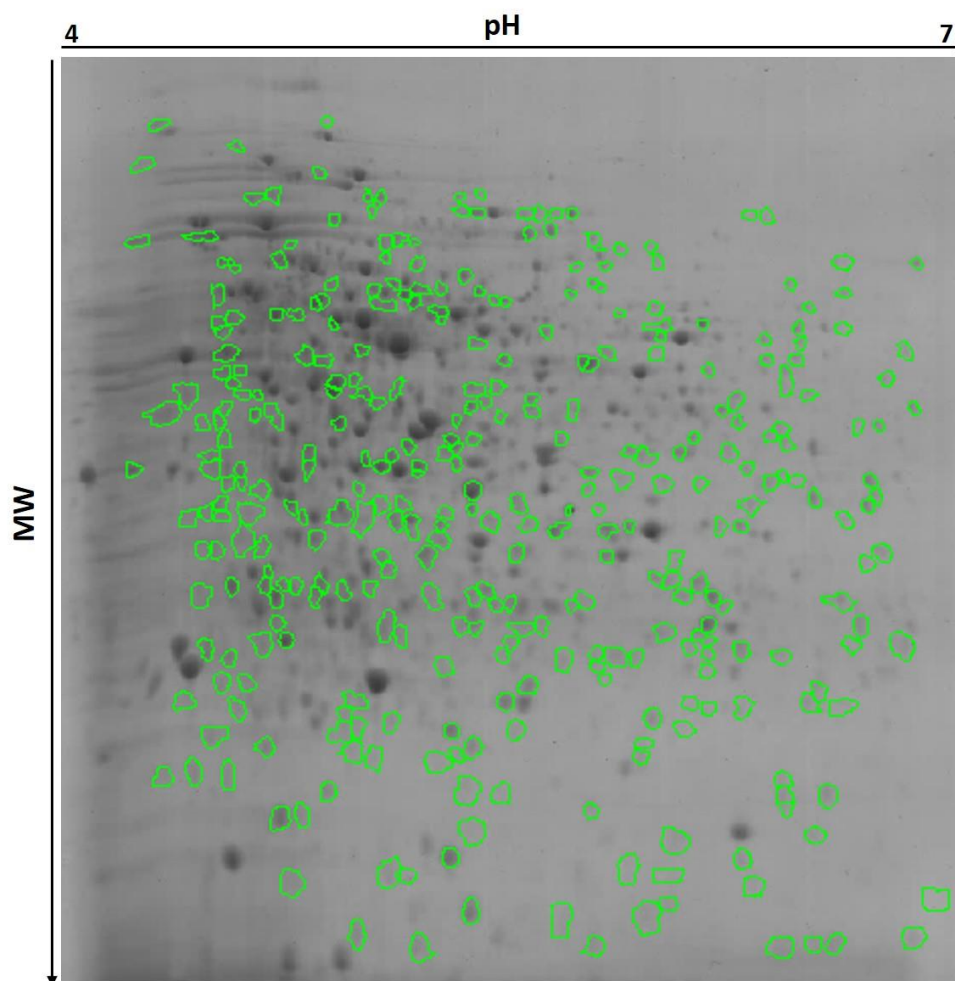
n.a. não ativo

**Tabela 6.6** - Massa e actividade dos compostos isolados da estirpe PTM-398 F8+F9\_F2 (MIC) contra MRSA e VRE.

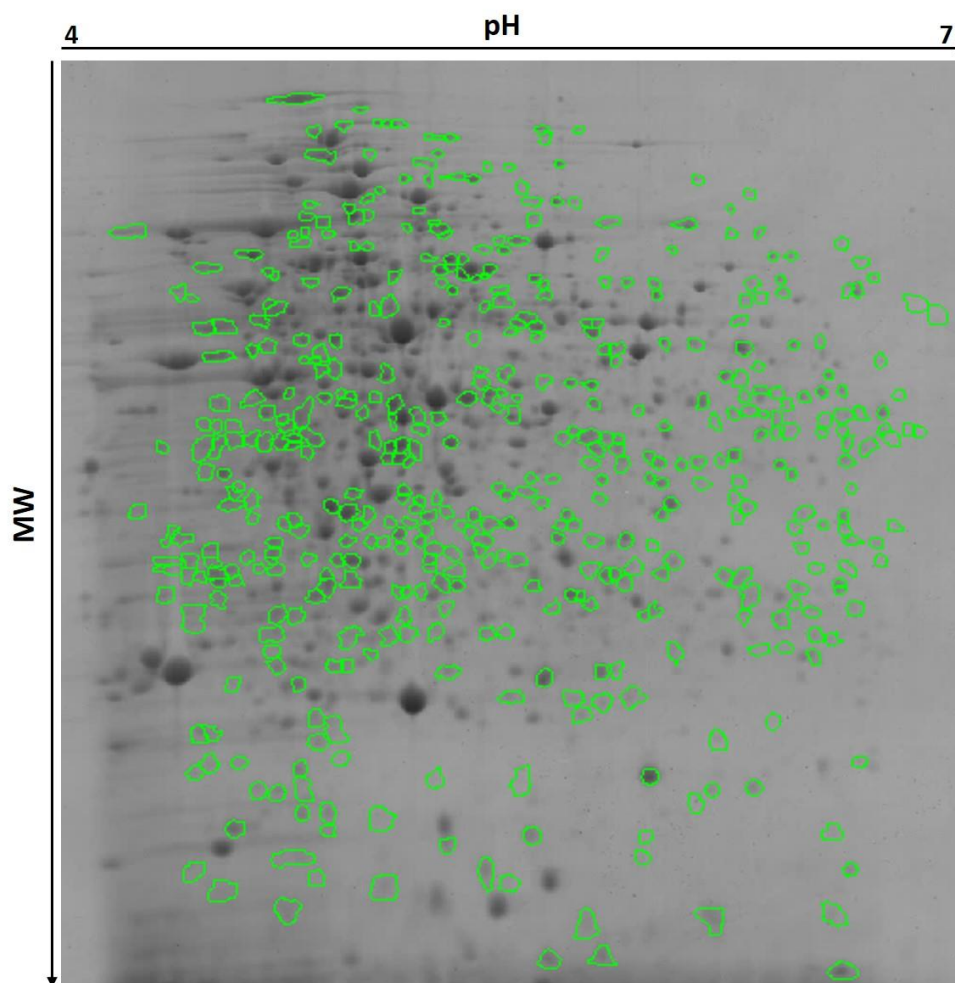
Amostra	Massa (mg)	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	
		MRSA COL	VRE EF82
F8+F9_F2_F4	0,33	n.a.	n.a.
F8+F9_F2_F7	0,36	n.a.	n.a.
F8+F9_F2_F13	0,28	n.a.	n.a.
F8+F9_F2_F15	0,44	n.a.	n.a.
F8+F9_F2_F18	0,34	n.a.	n.a.
F8+F9_F2_F26	0,84	n.a.	n.a.
F8+F9_F2_F28	0,51	n.a.	n.a.
F8+F9_F2_F30	0,86	n.a.	n.a.
F8+F9_F2_F33	0,3	n.a.	n.a.
F8+F9_F2_F42	0,99	n.a.	n.a.
F8+F9_F2_F45	0,4	n.a.	n.a.
F8+F9_F2_F48	0,38	n.a.	n.a.
F8+F9_F2_F51	0,39	n.a.	250
F8+F9_F1_F52	0,3	n.a.	n.a.
F8+F9_F2_F56	0,42	n.a.	n.a.
F8+F9_F2_F58	0,31	n.a.	250
F8+F9_F2_F61	0,28	n.a.	250
F8+F9_F2_F69	0,78	n.a.	250
F8+F9_F2_F71	1,6	n.a.	250
F8+F9_F2_F72	0,69	n.a.	250
F8+F9_F2_F73	0,84	250	62,5
F8+F9_F2_F74	0,5	125	125
F8+F9_F2_F75	0,76	15,6	3,91

n.a. não ativo

## 6.3. Anexo 3



**Figura 6.7** - *Spots* exclusivos do mapa do gel 2D do extrato proteico total da estirpe PTM-346. As proteínas foram separadas em *strips* de IPG de 11 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. [imagem obtida no *software Melanie 7.0*]



**Figura 6.8** - *Spots* exclusivos do mapa do gel 2D do extrato proteico total da estirpe PTM-398. As proteínas foram separadas em *strips* de IPG de 11 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. [imagem obtida no *software Melanie 7.0*]